

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diplomová práce

**Studium interakce inzulinu, IGF-1/2 a analogu IGF-1 s receptory
inzulinu a IGF-1**

Interaction studies of insulin, IGF-1/2 and IGF-1 analogue with insulin
and IGF-1 receptors

Bc. Martina Chrudinová

Konzultant: Mgr. Irena Selicharová, Dr.

Vedoucí práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením konzultanta Mgr. Ireny Selicharové, Dr. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Ireně Selicharové, Dr. za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost, ochotu a pochopení, a své vedoucí práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za cenné připomínky, vstřícné jednání a podporu při realizaci této diplomové práce. Děkuji také RNDr. Michaele Collinsové, PhD. za pomoc při syntéze IGF-1 analogu.

Poděkování patří Ing. Miroslavě Blechové ze skupiny Medicinální chemie ÚOCHB AV ČR za syntézu peptidových řetězců a Ing. Kvetoslavě Kertisové z vědecko-servisní skupiny Hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR za identifikaci peptidů.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému vědeckému týmu RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za všestrannou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také své rodině a blízkým za podporu při studiu.

ABSTRAKT

Inzulinu podobné růstové faktory 1 a 2 (IGF-1/2) jsou peptidy vykazující strukturní homologii s inzulinem. Jedná se o jednořetězcové peptidy, které se inzulinu podobají jak aminokyselinovou sekvencí, tak svou terciární strukturou. Hlavní funkcí těchto látek je stimulace buněčného růstu, proliferace a diferenciaci.

Jak inzulin, tak inzulinu podobné růstové faktory zprostředkovávají svou funkci pomocí membránových receptorů, konkrétně inzulinového receptoru, vyskytujícího se ve dvou izoformách (IR-A a IR-B), a IGF-1 receptoru. Jedná se o receptory s tyrosinkinasovou aktivitou, vyznačující se shodným podjednotkovým a doménovým složením. S aktivací receptorů je bezprostředně spojeno spuštění dvou vnitrobuněčných signálních drah. PI3-K/Akt signalizační dráha se podílí na transportu glukosy do buňky, stimulaci proliferace či inhibici apoptózy. Ras/MAPK dráha se podílí především na buněčném růstu a diferenciaci.

Vzhledem k podobnosti jak všech tří ligandů, tak i zmíněných membránových receptorů, může každý ligand více či méně aktivovat různé receptory a s nimi spojené signalizační dráhy. Dochází tedy k určitému překryvu funkcí inzulinu a obou IGF, stejně jako jejich receptorů. Na odlišení funkcí vyvolaných jednotlivými ligandy má jistě určitý podíl rozdílná tkáňová distribuce IGF-1 receptoru a obou izoform inzulinového receptoru. Byly však pozorovány rovněž rozdílné biologické efekty vyvolané stejným receptorem, avšak po aktivaci jiným ligandem. Mechanizmy způsobující toto odlišení funkcí nebyly dosud zcela objasněny.

K většímu porozumění problému napomáhá studium vlastností analogů inzulinu a obou IGF. V rámci této práce byl připraven dvouřetězcový analog IGF-1 sekvenčně se nelišící od přirozeného IGF-1, avšak postrádající peptidovou vazbu mezi Arg36 a Arg37 sekvence IGF-1. Následně byly porovnány vazebné afinity zmíněného analogu a lidského inzulinu, IGF-1 a IGF-2 k obou izoformám inzulinového receptoru a IGF-1 receptoru. Byla testována rovněž schopnost hormonů aktivovat inzulinový a IGF-1 receptor a s nimi spojené signalizační dráhy.

U dvouřetězcového IGF-1 analogu byla ve srovnání s IGF-1 pozorována ztráta schopnosti aktivovat IGF-1 receptor a s ním spojené signalizační dráhy. S ohledem na fakt, že látka shodná s námi nasyntetizovaným IGF-1 analogem byla dříve detekována v krevní plazmě, se dá předpokládat, že se jedná o degradační produkt IGF-1 postrádající

vlastní biologickou funkci. Dále byla pozorována zvýšená schopnost IGF-2 aktivovat izoformu A inzulinového receptoru a s ní spojené signální dráhy oproti izoformě B tohoto receptoru. Hojný výskyt izoformy A inzulinového receptoru byl v rámci různých výzkumů pozorován ve fetálních a rakovinných tkáních. IGF-2 se tedy pravděpodobně podílí na fetálním vývoji a rozvoji rakoviny.

Klíčová slova

Inzulinu podobný růstový faktor 1 a 2, inzulin, dvouřetězcový IGF-1 analog, inzulinový receptor, IGF-1 receptor, syntéza na pevné fázi, imunochemická detekce proteinů, signální dráhy, protein Akt, protein Erk

ABSTRACT

Insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF-1/2) are single-chain peptides exerting homology (in both amino-acid sequence and tertiary structure) to insulin. The main function of these peptides is promoting cellular growth, proliferation and differentiation.

Both insulin and insulin-like growth factors mediate their function through membrane receptors – insulin receptor (isoforms A and B) and IGF-1 receptor. All these receptors are members of the tyrosinkinase family of receptors and they exert the same subunit and domain composition. The activation of insulin and IGF-1 receptors is tightly associated with activation of two intracellular signaling pathways. The PI3-K/Akt pathway is involved in the glucose transport to the cell, induction of proliferation or inhibition of apoptosis, while the Ras/MAPK pathway is involved mainly in the induction of cell growth and differentiation.

Due to the structure similarity in both the ligands and receptors, every ligand can activate different receptors (with different potency) and the signaling pathways associated with these receptors. Thus, the functions of IGFs and insulin, the same as their receptors, are overlapping. The distinct function of the concrete ligand can be distinguished by the different tissue distribution of both isoforms of insulin receptor and the IGF-1 receptor. However, several research have shown that the same receptor can exert slightly different response under the activation by different ligands. The mechanisms of this issue are not yet well understood.

Synthesis of new insulin or IGF-1/2 analogues and testing of their properties help us to understand this issue. Within this thesis was synthesised a double-chain IGF-1 analogue with the amino-acid sequence not differing from wild type human IGF-1, but with the Arg36-Arg37 peptide bond missing. The binding affinities of the IGF-1 analogue, IGF-1, IGF-2 and insulin for IGF-1 receptor and both isoforms of insulin receptor were tested and compared, the same as the ability of the ligands to activate the receptors and associated intracellular signaling pathways.

The loss of ability to activate the IGF-1 receptor and the associated signaling pathways was observed under the receptor stimulation by the double-chain IGF-1 analogue compared to IGF-1. Considering that the substance identical to this analogue was detected in human plasma before, it may be a degradation product of IGF-1, which does not exert its own significant biological function. The increased ability of insulin receptor isoform A under the stimulation of IGF-2 compared to isoform B was also observed. Due to several

research, the insulin receptor isoform A is abundant in fetal and cancer tissues. Thus, it looks probable that IGF-2 is involved in the fetal and cancer development. (In Czech)

Key Words

Insulin-like growth factor 1 and 2, insulin, double-chain IGF-1 analogue, insulin receptor, IGF-1 receptor, solid-phase synthesis, immunoblotting, signaling pathways, Akt protein, Erk protein

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1 ÚVOD..... | 6 |
| 1.1 IGF-systém..... | 6 |
| 1.2 Historie..... | 7 |
| 1.3 Ligandy IGF-systému | 8 |
| 1.3.1 Inzulin | 8 |
| 1.3.2 Inzulinu podobné růstové faktory 1 a 2 (IGF-1 a IGF-2) | 9 |
| 1.4 Receptory IGF-systému | 10 |
| 1.4.1 Inzulinový receptor (IR) | 11 |
| 1.4.2 IGF-1 receptor (IGF-1R) | 13 |
| 1.4.3 Hybridní formy receptorů | 14 |
| 1.4.4 Mannosa-6-fosfátový/IGF-2 receptor | 14 |
| 1.5 Plazmatické proteiny vázající IGF-1/2..... | 15 |
| 1.6 Signalizační kaskády..... | 15 |
| 1.6.1 Aktivace receptorů..... | 15 |
| 1.6.2 Vnitrobuněčné substráty IR a IGF-1R..... | 16 |
| 1.6.3 PI3-K/Akt signalizační dráha..... | 17 |
| 1.6.4 Ras/MAPK signalizační dráha..... | 18 |
| 1.7 Afinita ligandů k receptorům | 19 |
| 1.8 Analogy inzulinu a inzulinu podobných růstových faktorů..... | 20 |
| 2 CÍL PRÁCE..... | 22 |
| 3 MATERIÁL..... | 23 |
| 3.1 Chemický materiál | 23 |
| 3.2 Biologický materiál..... | 25 |
| 3.3 Použité přístroje | 25 |
| 4 METODY..... | 27 |
| 4.1 Syntéza dvouřetězcového analogu IGF-1 (MC2) | 27 |
| 4.1.1 Syntéza aminokyselinových řetězců..... | 27 |
| 4.1.2 Štěpení řetězců z pevné fáze..... | 27 |
| 4.1.3 S-sulfonace..... | 28 |
| 4.1.4 Rekombinace | 29 |
| 4.1.5 Gelová chromatografie | 29 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.1.6 | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) | 30 |
| 4.1.7 | Hmotnostní spektrometrie..... | 31 |
| 4.2 | Stanovení vazebné afinity IGF-1, IGF-2, MC2 a inzulinu vůči IGF-1R a IR | 31 |
| 4.2.1 | Stanovení vazebné afinity ligandů vůči IGF-1R a IR-B..... | 32 |
| 4.2.2 | Stanovení vazebné afinity ligandů vůči IR-A..... | 33 |
| 4.3 | Studium aktivace IGF-1R a IR a následné signalizace zprostředkované IGF-1, IGF-2, MC2 a inzulinem | 33 |
| 4.3.1 | Pěstování buněk | 33 |
| 4.3.2 | Ředění roztoků ligandů pro stimulaci buněk | 34 |
| 4.3.3 | Stimulace IGF-1R a obou izoform IR různými ligandy | 34 |
| 4.3.3.1 | Stimulace IGF-1R různými ligandy..... | 34 |
| 4.3.3.2 | Stimulace IR-A a IR-B různými ligandy | 35 |
| 4.3.4 | Příprava lyzátů buněk pro elektroforetickou separaci v přítomnosti SDS..... | 35 |
| 4.3.5 | Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS..... | 35 |
| 4.3.6 | Imunochemická detekce proteinů | 36 |
| 5 | VÝSLEDKY..... | 38 |
| 5.1 | Příprava analogu MC2 | 38 |
| 5.1.1 | Příprava aminokyselinových řetězců pro následnou rekombinaci | 38 |
| 5.1.2 | Purifikace a identifikace MC2 | 41 |
| 5.2 | Stanovení vazebné afinity IGF-1, IGF-2, MC2 a inzulinu vůči IGF-1R a IR | 43 |
| 5.3 | Studium aktivace receptorů a následných vnitrobuněčných signalizačních drah .. | 44 |
| 5.3.1 | Porovnání množství proteinů ve vzorcích | 44 |
| 5.3.2 | Výběr protilátek | 46 |
| 5.3.3 | Testování aktivace IGF-1R a s ním spojených signalizačních drah | 47 |
| 5.3.3.1 | Časové závislosti..... | 47 |
| 5.3.3.2 | Koncentrační závislosti..... | 48 |
| 5.3.4 | Testování aktivace obou izoform IR a s nimi spojených signalizačních drah | 51 |
| 5.3.4.1 | Testování aktivace IR-A a s ním spojených signalizačních drah | 51 |
| 5.3.4.2 | Testování aktivace IR-B a s ním spojených signalizačních drah..... | 52 |
| 6 | DISKUSE..... | 55 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 61 |
| | SEZNAM LITERATURY..... | 62 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| ACN | Acetonitril |
| Akt | Proteinkinasa B |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| Boc | <i>Terc</i> -butyloxykarbonylová skupina |
| DCM | Dichlormethan |
| Dipea | <i>N,N</i> -diizopropylethylamin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DOK | Kinasa účastnící se pozdějších pochodů v rámci signalizačních drah (z angl. downstream of kinases) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDT | Ethandithiol |
| EDTA | Kyselina ethylendiamintetraoctová |
| Erk | Kinasa regulovaná extracelulárním signálem (z angl. extracellular signal regulated kinase) |
| ESI | Ionizace elektronovým sprejem (z angl. electrospray ionization) |
| FBS | Fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum) |
| Fmoc | 9-fluorenyl-methyloxykarbonylová skupina |
| Gab | Protein vázající Grb-2 (z angl. Grb-2 associated binder) |
| GDP | Guanosindifosfát |
| GTP | Guanosintrifosfát |
| HBTU | 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát |
| HEPES | kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-piperazinylethansulfonová |
| HOBt | N-hydroxybenzotriazol |

| | |
|------------|---|
| Grb | Protein vázající receptor růstového faktoru (z angl. growth factor receptor binding protein) |
| IGF | Inzulinu podobný růstový faktor (z angl. insulin-like growth factor) |
| IGFBP | IGF vázající protein (z angl. insulin-like growth factor binding protein) |
| IGF-1R | IGF-1 receptor |
| IR | Inzulinový receptor |
| IR-A | Izoforma A inzulinového receptoru |
| IR-B | Izoforma B inzulinového receptoru |
| IRS | Substrát inzulinového receptoru (z angl. insulin receptor substrate) |
| MAPK | Protein kinasa aktivovaná mitogenem (z angl. mitogen-activated protein kinase) |
| MEK | Kinasa MAPK a Erk proteinů (z angl. MAPK and Erk kinase) |
| M6P/IGF-2R | Mannosa-6 fosfátový/IGF-2 receptor |
| MS | Hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry) |
| p85 | Regulační podjednotka PI3-K |
| p110 | Katalytická podjednotka PI3-K |
| PDK | Fosfatidylinositol dependentní kinasy (z angl. phosphoinositide-dependent kinases) |
| PH | Plekstrin homologní |
| PI3-K | Fosfatidylinositol 3-kinasa (z angl. phosphatidylinositol 3-kinase) |
| PTB | Fosfotyrosin vázající (z angl. phosphotyrosine binding) |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Raf | Serin/threonin specifická protein kinasa, patří do rodiny Raf-kinas |

| | |
|-------|---|
| Ras | Signální protein s GTP-asovou aktivitou patřící do Ras-superrodiny |
| RTK | Receptor s vnitřní tyrosinkinasovou aktivitou (z angl. receptor tyrosine kinase) |
| SH2 | Src-homologní-2 (z angl. Src-homology-2) doména |
| Shc | Src homologní kolagen (z angl. Src homology collagen) |
| Sos | Jeden z faktorů vyměňujících guanin nukleotid (z angl. názvu Son of sevenless) |
| Src | Protoonkogenní tyrosinkinasa patřící do rodiny Src |
| TBu | <i>Terc</i> -butylová skupina |
| TFA | Kyselina trifluoroctová (z angl. trifluoroacetic acid) |
| TIS | Triizopropylsilan |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| Trt | Tritylová skupina |
| T-TBS | Tris/HCl pufr obsahující chlorid sodný a detergent Tween (z angl. Tween-Tris-buffered saline) |

Dále jsou používány jednopísmenné a třípísmenné zkratky aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB.

1 ÚVOD

1.1 IGF-systém

IGF (z anglického insulin-like growth factor, tedy inzulinu podobný růstový faktor) systém je rodina mitogenních růstových faktorů, extracelulárních vazebných proteinů a membránových receptorů, které se podílejí na regulaci růstu většiny orgánů a jejich nerovnováha může způsobit řadu patologických stavů¹. Konkrétně se jedná o systém tří peptidových hormonů (IGF-1, IGF-2 a inzulinu, který přesto, že jeho hlavní funkcí je transport glukózy do buněk a ovlivňování energetického metabolismu, může do určité míry ovlivňovat i buněčný růst a diferenciaci²), jejich membránových receptorů, tedy IGF-1 receptoru (IGF-1R), dvou izoform inzulínového receptoru (IR) a mannos-6-fosfátového/IGF-2 receptoru (M6P/IGF-2R), a šesti plazmatických proteinů, které jsou označovány jako IGFBP-1 až 6 (z anglického insulin-like growth factor binding protein) a podílejí se na regulaci množství volných IGF v plazmě³.

IGF-systém se podílí na regulaci buněčného růstu, proliferace, diferenciaci, apoptózy, migrace, ale také metabolismu, a ovlivňuje téměř každý orgán v těle³⁻⁵. V konečném důsledku jsou tyto procesy spojeny s tvorbou a růstem tkání, růstem kostí, rozvojem mozku a energetickým metabolismem a ovlivňují velikost a dlouhověkost organismu⁶. Zvýšená či snížená produkce IGF-1 se projevuje patologickými stavy jako je akromegalie v případě produkce zvýšené či Laronův syndrom v případě produkce snížené^{7, 8}. Zároveň jsou zvýšené plazmatické koncentrace IGF-1 a IGF-2 spojovány se zvýšeným rizikem vzniku a rozvoje rakoviny⁵.

Zatímco inzulin je tvořen β -buňkami Langerhansových ostrůvků ve slinivce, většina IGF-1 vzniká v játrech, kde je jeho produkce indukována růstovým hormonem. Z jater je IGF-1 sekretován do krevní plazmy a může tak endokrinně působit na další tkáně či orgány³. V menším množství je IGF-1 produkován i extrahepatálními tkáněmi (přední mozek, plíce, vaječníky, děloha, varlata, ledviny, srdce, mléčné žlázy nebo kosterní svalstvo), kde působí autokrinně či parakrinně⁹.

IGF-2 je na rozdíl od IGF-1 v játrech produkován jen minimálně, největší produkce byla zaznamenána v předním mozku, dále potom v děloze, ledvinách, srdci a kosterním svalstvu⁹. Produkce IGF-2 není na rozdíl od IGF-1 přímo regulována růstovým hormonem³.

1.2 Historie

Po předchozím zkoumání vztahu mezi extraktem ze slinivky a cukrovkou a prozatím neúspěšné snaze tento extrakt použít ke zlepšení stavu diabetických zvířat došlo k přelomu v roce 1921 díky výzkumu kanadského chirurga Fredericka G. Bantinga a studenta fyziologie a biochemie Charlese H. Besta. Těm se podařilo dosáhnout povzbudivých výsledků u diabetických psů, kterým byl podáván extrakt z podvázané psí slinivky¹⁰. Po dalším vylepšení postupů k získání čistšího extraktu ze zvířecích slinivek byl v roce 1922 extrakt podán prvnímu lidskému pacientovi, čtrnáctiletému chlapci Leonardu Thomsonovi, u kterého následně došlo k výraznému zlepšení stavu¹¹. Inzulin se poté začal produkovat ve větším množství, brzy se do výroby zapojila i první komerční firma, Eli Lilly and Company. V roce 1923 získal F. G. Banting a jeho další spolupracovník J. J. R. Macleod za objevení inzulinu Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu¹². V roce 1926 byl inzulin poprvé připraven v krystalické podobě¹³. K dalšímu přelomu historie nejen inzulinu došlo potom v 50. letech 20. století, kdy se Fredericku Sangerovi povedlo u obou řetězců hovězího inzulinu jako u první látky proteinové povahy zjistit aminokyselinovou sekvenci¹⁴⁻¹⁷, za což byl v roce 1958 oceněn Nobelovou cenou za chemii¹².

IGF-1 byl poprvé identifikován v 50. letech 20. století jako látka obsažená v krevním séru, jejíž tvorba je indukována růstovým hormonem, a která byla později nazvána „somatomedin“^{18, 19}. Mezitím byla zároveň v lidském séru objevena látka s účinky podobnými inzulinu, jejíž aktivita však není potlačitelná protilátkami proti inzulinu, a u které bylo prokázáno, že vykazuje účinky podporující růst²⁰. Později byla tato látka, IGF-1, stejně jako IGF-2 izolována a bylo zjištěno, že IGF-1 je identický se sometomedinem²¹. Obě látky, sekvenčně a strukturně podobné inzulinu, avšak vykazující ve vyšší míře účinky podporující růst než účinky ovlivňující metabolismus glukosy, byly pojmenovány jako „inzulinu podobný růstový faktor“ 1 a 2²².

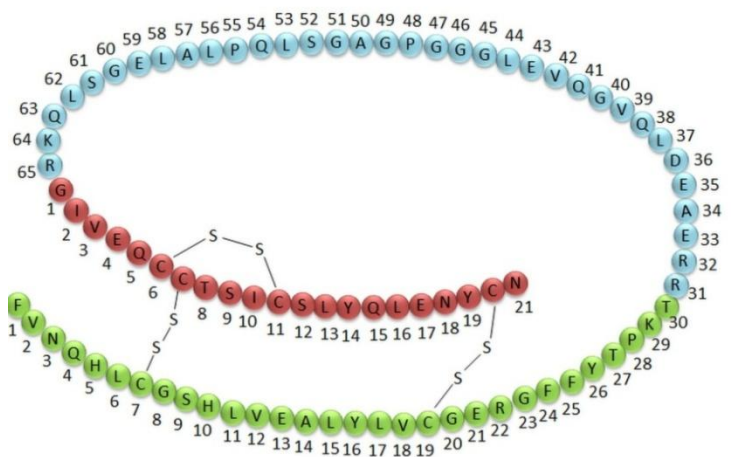
1.3 Ligandy IGF-systému

1.3.1 Inzulin

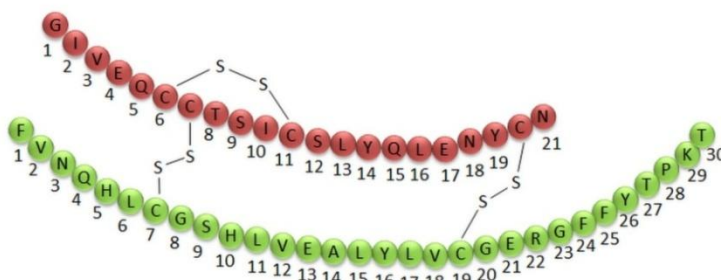
Lidský inzulin je dvouřetězcový peptidový hormon obsahující celkem 51 aminokyselin. Řetězce inzulinu jsou označovány jako A a B, řetězec A obsahuje 21 aminokyselin, řetězec B 30 aminokyselin²³. Struktura obsahuje 3 disulfidické můstky, 2 z nich jsou mezi řetězci (první spojuje Cys7 řetězce A s Cys7 řetězce B, druhý Cys20 řetězce A s Cys19 řetězce B). Třetí disulfidický můstek spojuje Cys6 a Cys11 v řetězci A²⁴ (viz **obr. 1**).

V organismu vzniká inzulin z jednořetězcových prekurzorů preproinzulinu a následně proinzulinu. Ribosomy hrubého endoplazmatického retikula v β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní syntetizují preproinzulin, který díky signální sekvenci obsažené v molekule přechází do lumen hrubého endoplazmatického retikula, kde je signální sekvence odštěpena za vzniku proinzulinu²⁵. Ten je transportován do Golgiho aparátu, kde je z molekuly vyštěpena sekvence o 35 aminokyselinách (v případě lidského inzulinu), známá jako tzv. C-peptid, čímž vzniká inzulin²⁶.

Proinzulin



Inzulin



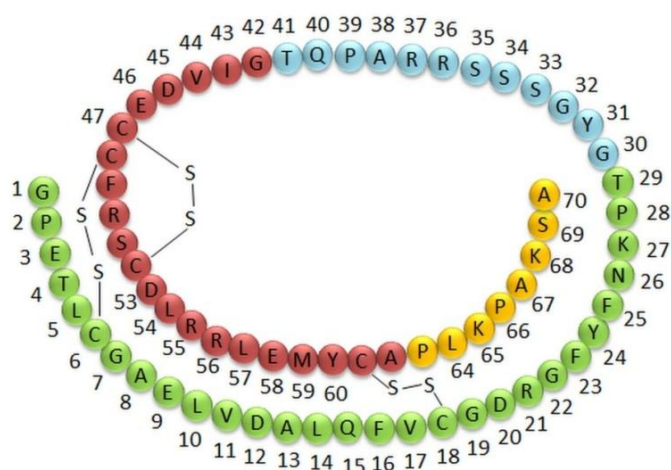
Obrázek 1:

Aminokyselinové sekvence lidského proinzulinu a inzulinu. Zeleně je vyznačen B-řetězec, červeně A-řetězec, modře tzv. C-peptid, který je z proinzulinu vyštěpován za vzniku inzulinu.

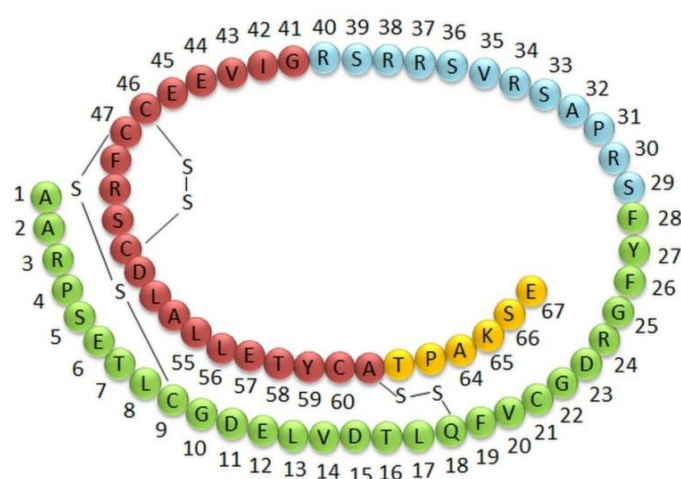
1.3.2 Inzulinu podobné růstové faktory 1 a 2 (IGF-1 a IGF-2)

IGF-1 a IGF-2 jsou jednořetězcové peptidy obsahující 70 (IGF-1) a 67 (IGF-2) aminokyselin. Jejich sekvence je rozdělena do 4 domén (A, B, C, D), které jsou znázorněny na **obrázku 2**. A a B domény obou peptidů se ve své sekvenci přibližně z 50% shodují s A a B řetězcí inzulínu, stejně tak je možné nalézt asi 70% sekvenční podobnost mezi IGF-1 a IGF-2 navzájem (viz **obr. 3**, str. 10). C domény obou IGF však nevykazují homologii s C-peptidem proinzulinu. IGF-1 a IGF-2 obsahují analogické disulfidické vazby jako inzulin (proinzulin)^{27, 28}.

IGF-1



IGF-2

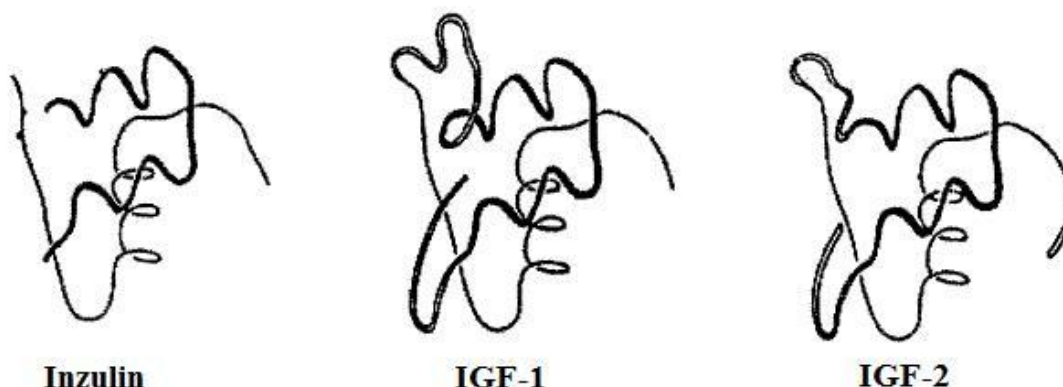


Obrázek 2: Aminokyselinové sekvence lidského IGF-1 a IGF-2. Zeleně je zobrazena B-doména, modře C-doména, červeně A-doména a žlutě D-doména.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----------------------------------|--|--|--|--|------------------------------------|--|--|--|--|----------------------|--|--|--|--|
| Inzulín | B-řetězec FVNQHLCGSHLVEAFLYLVCGERGEFYTPKT | | | | | | | | | | A-řetězec GIVEQCCTSIQLYQLENYCN | | | | | | | | | | | | | | |
| IGF-1 | B-doména GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT | | | | | | | | | | C-doména GYGSSRRAPQT | | | | | A-doména GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA | | | | | D-doména PLKPAKS | | | | |
| IGF-2 | B-doména AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYF | | | | | | | | | | C-doména SRPASR - -VSRRS - -R | | | | | A-doména GIVEECCFRSCDLALLEITYCA | | | | | D-doména - -TPAKS | | | | |

Obrázek 3: Sekvenční podobnost mezi inzulinem (modře), IGF-1 (červeně) a IGF-2 (zeleně). Žlutě jsou znázorněny aminokyseliny, které jsou shodné alespoň ve dvou ze tří peptidů.

Co se týče terciární struktury, i zde byla pozorována podobnost mezi inzulinem, IGF-1 a IGF-2. Ve všech třech peptidech jsou majoritními strukturami 3 analogické α -helixy²⁹⁻³¹. Podobnost struktur mezi jednotlivými peptidy je znázorněna na **obrázku 4**.



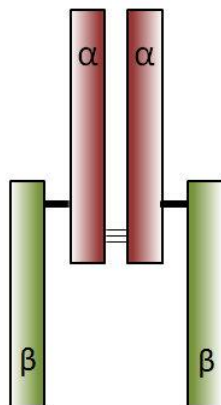
Obrázek 4: Schematické znázornění terciárních struktur inzulinu, IGF-1 a IGF-2 založené na krystalografických studiích. Převzato a upraveno dle³².

Strukturní a funkční podobnosti mezi inzulinem a IGF-1 podporují hypotézu, že oba peptidy vznikly ze společné prekurzorové molekuly, která se pravděpodobně účastnila regulace příjmu potravy a buněčného růstu³³.

1.4 Receptory IGF-systému

Mezi receptory IGF-systému patří inzulinový receptor a IGF-1 receptor. Jedná se o blízce příbuzné transmembránové receptory s vnitřní tyrosinkinasovou aktivitou, patřící do třídy II rodiny RTK (z angl. receptor tyrosine kinase)³⁴.

Jde o dimery (heterotetramery) skládající se ze dvou α a dvou β -podjednotek (uspořádání β - α - α - β – viz **obr. 5**), přičemž α -podjednotky jsou extracelulární, zatímco β -podjednotky prostupují z extracelulárního prostoru membránou do cytoplazmy. Podjednotky jsou dohromady vázány pomocí disulfidickými můstky a nekovalentních interakcí³⁵.



Obrázek 5: Schéma podjednotkového složení heterotetrameru IR a IGF-1R. α -podjednotky jsou znázorněny červeně, β -podjednotky zeleně.

Zatímco hlavní oblasti podílející se na vazbě ligandů se nacházejí na α -podjednotkách³⁶, oblasti s tyrosinkinasovou aktivitou jsou lokalizovány na cytoplazmatické části podjednotek β ³⁷.

Oba receptory jsou syntetizovány ve formě prekurzorů, které jsou následně glykosylovány, dimerizovány a proteolyticky upraveny za vzniku oddělených α a β -řetězců^{38, 39}.

Původně byla inzulinovému receptoru přiřazována primárně metabolická funkce, zatímco u IGF-1 receptoru se předpokládalo, že vykazuje účinky převážně mitogenního či proliferativního charakteru. Novější výzkumy však ukazují, že tento pohled je výrazně zjednodušený a ve skutečnosti se jedná o mnohem komplexnější systém^{1, 40}.

1.4.1 Inzulinový receptor (IR)

Gen kódující lidský IR je lokalizován na chromosomu 19 a skládá se ze 22 exonů. IR se vyskytuje ve dvou izoformách (IR-A a IR-B) lišících se přítomností

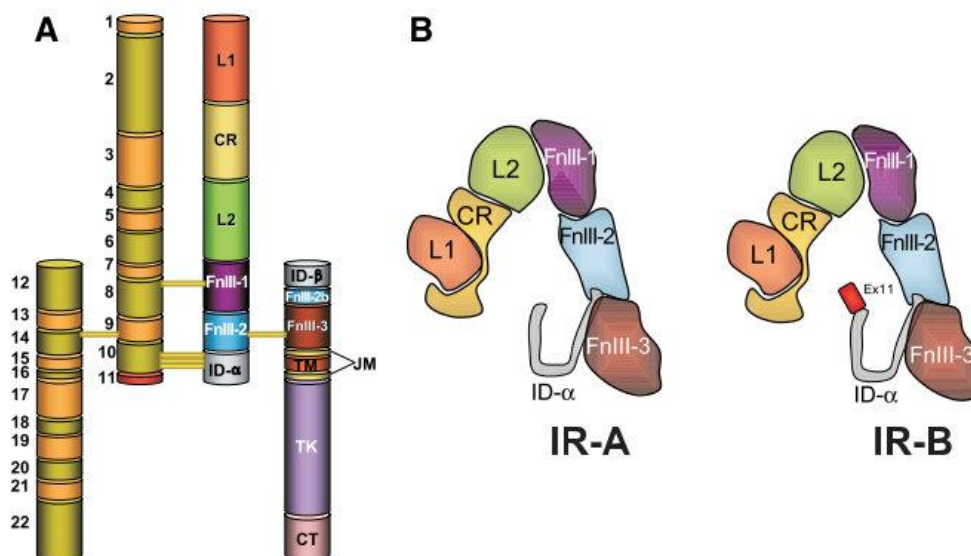
12-ti aminokyselinové sekvence na C-konci α -podjednotky (přítomna v izoformě IR-B, nepřítomna v IR-A, viz **obr. 6**, str. 13), kódované exonem 11 a nazývané jako α -CT (z angl. α -carboxy-terminal) peptid. Vznik dvou různých izoform inzulínového receptoru je způsoben alternativním sestřihem právě exonu 11⁴¹. Konkrétně je v případě IR-B zmíněná sekvence vložena mezi aminokyseliny 716 a 717 IR-A⁴².

α -podjednotka inzulínového receptoru obsahuje (v případě IR-A) 719 aminokyselin o molekulové hmotnosti 135 kDa, β -podjednotka se skládá z 620 aminokyselin a její molekulová hmotnost je 95 kDa⁴¹.

α -podjednotky obsahují 2 globulární „velké“ domény bohaté na leucin - L1 a L2 (z angl. „large domain“), které jsou vzájemně odděleny regionem bohatým na cystein (CR, z angl. „cysteine-rich“). Následují fibronectinové domény typu III (FnIII-1, FnIII-2), z nichž druhá je rozdělena další vloženou doménou (ID, z angl. „insert domain“), která obsahuje 3 disulfidické můstky spojující obě α -podjednotky.

Extracelulární část β -podjednotky obsahuje kromě druhé části ID (ID- β) a FnIII-2 (FnIII-2b) další fibronectinovou doménu typu III (FnIII-3). Vnitrobuněčná část β -podjednotky obsahuje tyrosinkinasovou doménu (TK) obklopenou z jedné strany juxtamembránovou doménou, obsahující transmembránovou část, a z druhé CT (z angl. carboxy-terminal tail) doménou⁴²⁻⁴⁴. Doménové složení α a β -podjednotek je znázorněno na **obrázku 6** (str 13).

Obě izoformy inzulínového receptoru jsou ve vysoké míře exprimovány ve tkáních citlivých na inzulín (svalové tkáně, adipocyty). V játrech převažuje exprese izoformy IR-B⁴⁵. Naopak vysoká exprese IR-A byla pozorována v embryonálních a rakovinných tkáních⁴⁶. Ke změnám v poměru obou izoform IR dochází u pacientů s cukrovkou typu II, u kterých bylo ve svalových tkáních pozorováno větší množství IR-B než u pacientů zdravých⁴⁷.



Obrázek 6: A: Modelové znázornění $\alpha_2\beta_2$ struktury IR. Levá část obrázku znázorňuje aminokyselinové segmenty kódované jednotlivými exony (1-22) genu pro IR. Pravá část obrázku znázorňuje doménové složení IR. B: Schematické znázornění 3D-struktury α -podjednotky a části β -podjednotky IR-A a IR-B. L1 a L2 – „velké“ domény bohaté na leucin; CR – region bohatý na cystein; FnIII-1, FnIII-2 a FnIII-3 – fibronektinové domény typu III, ID – vložená doména; TM – transmembránová část; JM – juxtamembránová doména; TK – tyrosinkinasová doména; CT – region C-konce β -podjednotky. Červeně je znázorněna sekvence kódovaná exonem 11, vyskytující se pouze v izoformě IR-B. Převzato a upraveno dle⁴⁴.

1.4.2 IGF-1 receptor (IGF-1R)

IGF-1 receptor je kódován genem obsahujícím 21 exonů, z nichž 12 má identickou velikost jako odpovídající exony genu pro IR. V případě zbylých exonů (s výjimkou prvního a posledního) rozdíly ve velikosti nepřesahují 15 nukleotidů^{41, 48}. V genu pro IGF-1R nebyl nalezen exon odpovídající exonu 11 pro IR⁴⁸. Gen pro IGF-1R se nachází na chromosomu 15⁴⁹.

Podjednotkové a doménové složení IGF-1R je totožné s IR³⁸. α -podjednotka IGF-1 receptoru obsahuje 707 aminokyselin a β -podjednotka 626 aminokyselin⁴⁹.

Největší podobnost v aminokyselinové sekvenci (84%) mezi IR a IGF-1R je možné najít mezi tyrosinkinasovými doménami v β -podjednotce. Rovněž

v α -podjednotce je možné najít až 67% podobnost, regiony bohaté na cystein vykazují podobnost 48%. Nejmenší homologii v aminokyselinové sekvenci (27%) vykazují transmembránové domény³³.

Expresce IGF-1 receptoru byla potvrzena téměř ve všech buněčných typech (např. svalové buňky, tukové buňky, fibroblasty, placentární buňky, erytrocyty)^{3, 50}.

1.4.3 Hybridní formy receptorů

Vzhledem k podobnosti monomerů obou izoform IR i IGF-1R může v buňkách, ve kterých se vyskytuje více typů zmíněných receptorů, docházet ke vzniku tzv. hybridních forem těchto receptorů, tedy forem, kdy receptor obsahuje jednu α a jednu β -podjednotku jednoho typu receptoru a to samé jiného receptoru.

Bylo prokázáno, že v buňkách náhodně dochází ke vzniku IR-A/IR-B hybridních forem receptoru⁵¹, stejně jako IGF-1R/IR (A/B) forem⁵². Fyziologické funkce těchto hybridních receptorů dosud nebyly zcela objasněny⁴⁴.

1.4.4 Mannosa-6-fosfátový/IGF-2 receptor

Kromě IR, IGF-1R a jejich hybridních forem ještě do IGF-systému patří tzv. mannos-6-fosfátový/IGF-2 receptor, také známý jako kation-independentní mannos-6-fosfátový receptor⁶. Tento receptor má mnohonásobně vyšší afinitu pro vazbu IGF-2 než pro vazbu IGF-1 a inzulin neváže ani při vysokých koncentracích⁵³. Jedná se o protein skládající se z velké extracelulární domény (2269 aminokyselin), transmembránové domény (23 aminokyselin) a malé cytoplazmatické domény (163 aminokyselin)⁵⁴, který nevykazuje vnitřní tyrosinkinasovou aktivitu. Receptor se kromě membránové formy vyskytuje také v krevním séru ve formě rozpustné, přičemž tato forma neobsahuje cytoplazmatickou doménu⁵⁵.

M6P/IGF-2R se podílí na degradaci a odstranění IGF-2 z cirkulace, přičemž jeho vlastní signalizační funkce je předmětem výzkumů a debat. Další funkcí M6P/IGF-2R je vazba mannos-6-fosfátových zbytků přítomných v nově nasyntetizovaných lyzomálních hydrolásach a jejich doprava do lyzosomů⁵⁶.

1.5 Plazmatické proteiny vázající IGF-1/2

Kromě ligandů a jejich receptorů patří do IGF-systému také 6 plazmatických proteinů, tzv. IGFBP-1 až 6, které jsou schopny vázat inzulinu podobné růstové faktory a regulovat tím koncentraci volných IGF v plazmě^{3, 6}. V dospělém lidském organismu je plazmatická koncentrace IGF-1 asi 20 nM a IGF-2 asi 60 nM (plazmatická koncentrace inzulinu je potom méně než 0,1 nM)⁵⁷. Vazba IGF-1 a IGF-2 na IGFBP chrání IGF1/2 před proteolýzou a prodlužuje tím jejich poločas života, čímž v důsledku zvyšuje množství IGF, které se mohou podílet na aktivaci IGF-1R či IR. Na druhou stranu však vazba inzulinu podobných růstových faktorů na IGFBP může také aktivitu IGF-1R/IR snižovat kompetitivní inhibicí vazby IGF-1/2 k těmto receptorům³. Bylo zjištěno, že pouze malé množství IGF-1/2 se v plazmě vyskytuje volně, více než 99% je přítomno v komplexu s IGFBP⁵⁷. Vazba IGF-1 a 2 není jedinou funkcí IGF vázajících proteinů, některé z nich vykazují i další funkce nezávislé na inzulinu podobných růstových faktorech^{58, 59}.

1.6 Signalizační kaskády

Funkce IR a IGF-1R jsou zprostředkovány pomocí dvou hlavních signalizačních drah, a to fosfatidylinositol 3-kinasové (PI3-K, z angl. phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt dráhy a Ras/MAPK (z angl. mitogen-activated protein kinase) dráhy. Obě tyto dráhy fungují na principu kaskádovité fosforylace rozličných cílových proteinů s různými biologickými účinky³⁴.

1.6.1 Aktivace receptorů

Vazba ligandu na receptor způsobuje konformační změnu receptoru, která má za následek autofosforylaci tyrosylových zbytků v intracelulární části β -podjednotky. Celkem bylo identifikováno 7 tyrosylových zbytků, které podléhají autofosforylaci na IR. Jde o Tyr965 a Tyr972, které jsou lokalizovány v juxtamembránové doméně, Tyr1158, Tyr1161 a Tyr1162, lokalizované v aktivační kličce tyrosinkinasové domény, a nakonec Tyr1328 a Tyr1334, umístěné poblíž C-konce řetězce⁶⁰. Zmíněné číslování odpovídá izoformě B inzulinového receptoru. V případě IR-A se analogický tyrosin

vyskytuje vždy na pozici o 12 nižší než v případě IR-B. Pro větší přehlednost je však dále ve všech případech uváděno číslování odpovídající izoformě IR-B.

Autofosforylace tyrosylových zbytků v aktivační kličce, tedy Tyr1158, Tyr1162 a Tyr1163, je považována za stěžejní pro fosforylaci dalších substrátů. Bylo prokázáno, že mutace jednoho, dvou či všech tří těchto tyrosinů způsobují výrazné snížení biologické aktivity IR⁶¹. Fosforylace tyrosylových zbytků v aktivační kličce má za následek odkrytí regionu s kinasovou aktivitou a tím usnadňuje přístup ATP a substrátů, jako jsou IRS (z angl. insulin receptor substrate) a Shc (z angl. Src homology collagen)^{62, 63}.

Autofosforylace Tyr1328 a Tyr1334 na C-konci řetězce pravděpodobně nehraje roli v aktivaci kinasové aktivity receptoru^{64, 65}, biologická role C-konce stále není zcela jasná^{65, 66}. Fosforylace Tyr965 a Tyr972 se pravděpodobně podílí na výběru a vazbě substrátu⁶⁷ (viz **kapitola 1.6.2**).

Stejně jako v IR i v IGF-1R je pro přenos dalšího signálu stěžejní autofosforylace tří tyrosylových zbytků v aktivační kličce, v tomto případě se jedná o Tyr1131, Tyr1135 a Tyr1136. Vyřazení těchto aminokyselin (stejně jako vyřazení analogických tyrosinů v IR) snižuje aktivitu receptoru⁶⁸.

1.6.2 Vnitrobuněčné substráty IR a IGF-1R

Existuje nejméně 11 vnitrobuněčných substrátů IR a IGF-1R². Všechny obsahují tzv. PTB (z angl. phosphotyrosine binding) doménu, která umožňuje vazbu k oblastem obsahujícím specifické fosforylované tyrosylové zbytky. Vazebný partner pro tuto doménu vzniká po aktivaci receptoru, a to v juxtamembránové doméně autofosforylací tyrosylového zbytku vyskytujícího se v tzv. NPEY motivu (aminokyselinová sekvence Asn-Pro-Glu-Tyr). Konkrétně se jedná o Tyr972 v případě IR a Tyr950 v případě IGF-1R^{34, 69}.

Nejvýznamnější z vnitrobuněčných substrátů IR a IGF-1R jsou ty, které patří do rodin IRS a Shc^{2, 34, 69}. Mezi další substráty patří například proteiny Gab (z angl. Grb-2 associated binder)⁷⁰ nebo DOK (z angl. downstream of kinase)⁷¹.

IRS rodina obsahuje poměrně specifické substráty receptorů s vnitřní tyrosinkinasovou aktivitou. Bylo identifikováno 6 členů této rodiny (IRS-1 až 6)⁷²⁻⁷⁶. Jedná se o signální proteiny, které samy nemají katalytickou aktivitu, fungují však jako

spojující články mezi receptorem a dalšími složkami signalizační kaskády (angl. označení „docking proteins“)⁷⁷. Všechny IRS se vyznačují podobnou strukturou, kromě PTB domény obsahují ještě tzv. PH (plekstrin homologní) doménu, která se váže k membránovým fosfolipidům a stabilizuje vazbu na receptor^{78, 79}. Jednotliví zástupci rodiny se však liší subcelulární lokalizací a interakcemi s dalšími proteiny signalizačních drah⁸⁰. Produkce IRS se také liší mezi jednotlivými tkáněmi⁸¹. Na signalizaci vyvolané IR a IGF-1R se největší měrou podílí IRS-1 a IRS-2³⁴.

Shc proteiny jsou alternativní substráty IR a IGF-1R. Mezi savci byly identifikovány tři geny kódující Shc proteiny, jejichž produkty byly nazvány ShcA, ShcB a ShcC^{82, 83}. Protože NPEY sekvence nemá tak vysokou afinitu pro PTB domény obsažené v Shc⁸⁴ jako pro PTB domény IRS, jsou Shc proteiny efektivněji fosforylovány ostatními tyrosinkinasami. Přesto však Shc proteiny kompetují s IRS proteiny o vazbu k IR či IGF-1R⁸⁵.

Zatímco IRS proteiny se podílejí na regulaci jak metabolických, tak růstových signálních drah, zdá se, že Shc proteiny aktivují pouze dráhy mitogenní^{2, 34}.

1.6.3 PI3-K/Akt signalizační dráha

IRS proteiny obsahují kromě oblastí zodpovědných za vazbu k receptoru také oblasti vázající proteiny, které se účastní dalších kroků signalizačních drah. K vazbě mezi IRS a těmito proteiny dochází po fosforylaci specifických tyrosylových zbytků, obsažených v IRS proteinech, receptorem. Všechny proteiny vázající IRS obsahují tzv. SH2 (z angl. Src-homology-2) doménu, která je schopná se na tyto fosfotyrosiny vázat^{2, 86}.

Mezi proteiny obsahující SH2 doménu patří také regulační podjednotka fosfatidylinositol 3-kinasy, tzv. p85⁶⁴, která po vazbě na IRS aktivuje katalytickou podjednotku P3I-K, tzv. p110⁸⁷, což vede ke vzniku fosfatidylinositoltrifosfátu z fosfatidylinositoldifosfátu. Ten aktivuje fosfatidylinositol-dependentní kinasy (PDKs, z angl. phosphoinositide-dependent kinases), které poté fosforylují a aktivují další proteinkinasy^{2, 34, 69, 86}. Pravděpodobně nejvýznamnější z těchto enzymů je PDK-1, která je mimo jiné zodpovědná za aktivaci Akt (proteinkinasa B)⁸⁸, což je protein, který zprostředkovává většinu účinků vyvolaných pomocí PI3-K, a to

fosforylací dalších proteinkinás, signálních proteinů nebo transkripčních faktorů². Průběh PI3/Akt singalizační dráhy je schématicky znázorněn na **obrázku 7** (str 19).

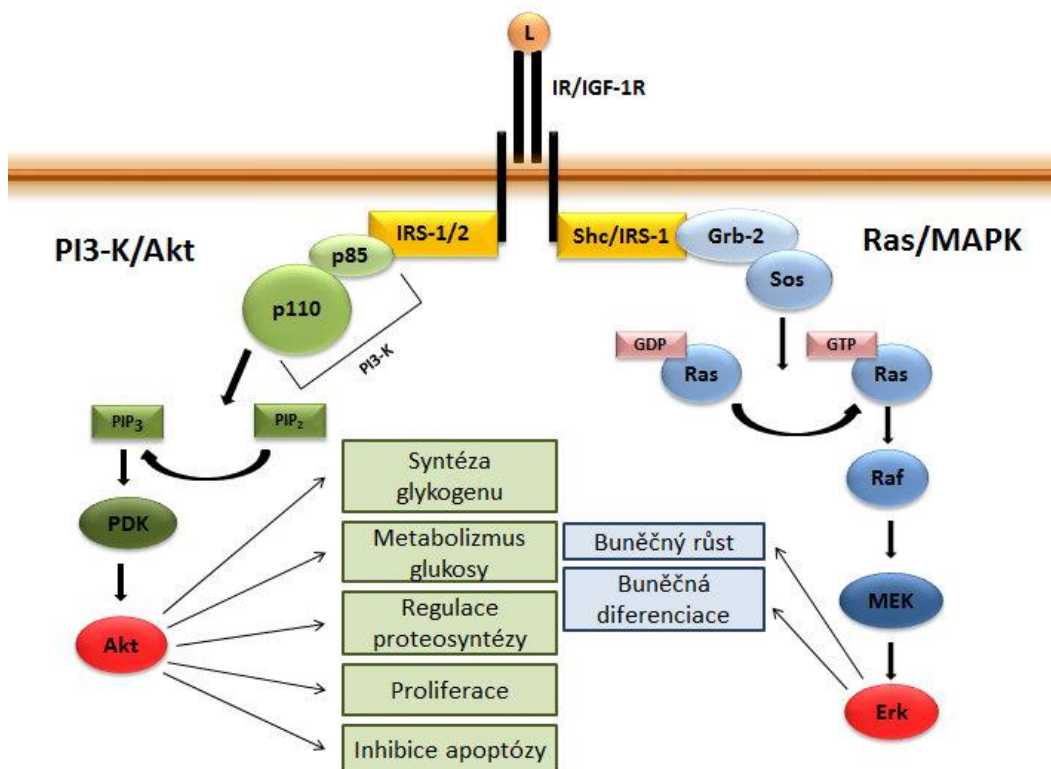
Mezi konečné účinky PI3-K/Akt signalizační dráhy patří například syntéza glykogenu, transport glukosy do buňky, regulace proteosyntézy, proliferace nebo inhibice apoptózy⁸⁹⁻⁹².

1.6.4 Ras/MAPK signalizační dráha

Ras/MAPK signálizační dráha, která je spojena především s mitogenními účinky, může využívat jako vnitrobuněčné substráty receptorů jak IRS (konkrétně IRS-1), tak i Shc proteiny⁹³. Přestože se zdá, že v některých typech buněk je aktivace Ras/MAPK dráhy vyvolávána především působením Shc proteinů^{94, 95}, jinde má hlavní podíl na aktivaci této dráhy působení pomocí IRS⁹⁶.

Pro aktivaci Ras/MAPK dráhy je nejprve nutná interakce mezi fosforylovaným IRS-1 či Shc a tzv. Grb-2 proteinem (z angl. growth factor receptor binding protein-2). Ten následně interaguje s proteinem Sos (z angl. Son of sevenless), který výměnou GDP za GTP aktivuje G-protein Ras⁹⁷. Z Ras proteinu je signál přenesen na protein Raf, který spouští kinasovou kaskádu, jejímž výsledkem je fosforylace a aktivace kinas MEK-1 a MEK-2 (z angl. MAPK and Erk kinase), které v závěru fosforylují Erk-1 a Erk-2 (z angl. extracellular signal-regulated kinase), proteiny patřící do rodiny MAPK^{2, 69, 86, 98}. Průběh signalizační dráhy Ras/MAPK je schématicky znázorněn na **obrázku 7** (str. 19).

Aktivované proteiny Erk následně fosforylují další cílové proteiny, mezi které patří například ribosomální proteiny a transkripční faktory, čímž dochází ke stimulaci genové exprese⁹⁹. Ras/MAPK signalizační dráha je zodpovědná především za zprostředkování buněčného růstu a diferenciac².



Obrázek 7: Schématické znázornění PI3-Akt (zelená) a Ras/MAPK (modrá) signalizačních drah. L – ligand aktivující inzulinový/IGF-1 receptor; IRS a Shc – vnitrobuněčné substráty receptoru, PI3-K – fosfatidylinositol 3-kinasa; p85 – regulační podjednotka PI3-K; p110 – katalytická podjednotka PI3-K; PIP₂ – fosfatidylinositoldifosfát; PIP₃ – fosfatidylinositoltrifosfát; PDK – fosfatidylinositol dependentní kinasa; Akt – protein Akt; Grb-2 – protein vázající receptor růstového faktoru; Sos – faktor vyměňující guanin nukleotid „Son of sevenless“; Ras – protein Ras; Raf – protein Raf; MEK – kinasa MAPK a Erk proteinů; Erk – kinasa regulovaná extracelulárním signálem.

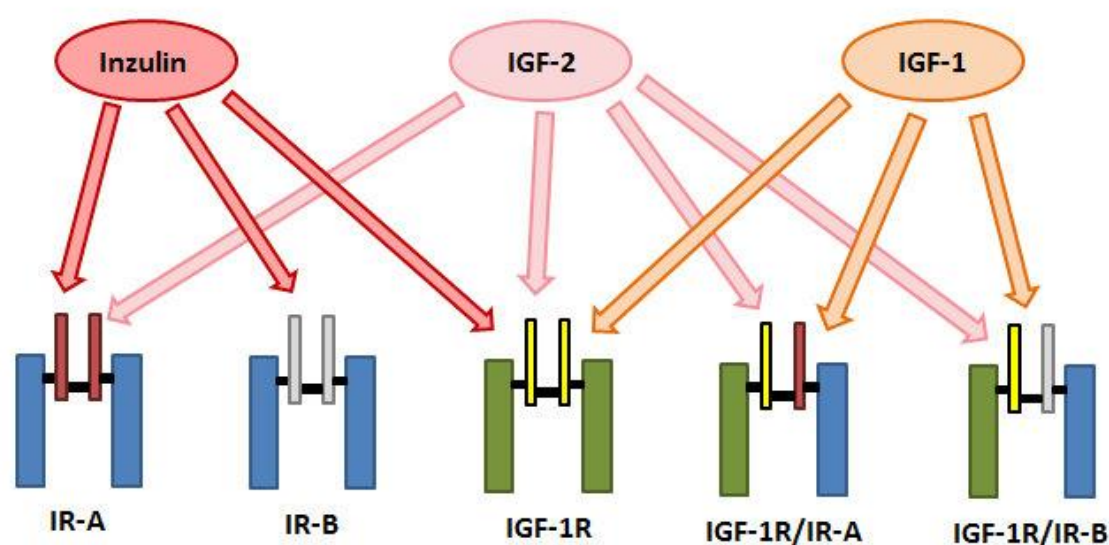
1.7 Afinita ligandů k receptorům

Vzhledem k podobnosti mezi strukturami jak inzulinu, IGF-1 a IGF-2, tak i IGF-1 receptoru a oběma izoformami inzulinového receptoru (popřípadě jejich hybridními formami) mají jednotlivé ligandy větší či menší afinitu k více zmíněným receptorům.

Obě izoformy IR vážou inzulin s vysokou afinitou, afinita pozorovaná pro inzulin k izoformě IR-A byla však o něco vyšší¹⁰⁰. IR-A (nikoliv však IR-B) váže

s relativně vysokou afinitou také IGF-2⁴⁶. IGF-1 je oběma izoformami IR vázán s nízkou afinitou. IGF-1R váže s nejvyšší afinitou IGF-1, s nižší afinitou IGF-2 a inzulin s afinitou nejnižší¹⁰¹.

IGF-1R/IR hybridní formy receptorů vážou oba inzulinu podobné růstové faktory s afinitou vysokou, zatímco inzulin s afinitou nízkou¹⁰². Vazba jednotlivých ligandů k různým receptorům je schématicky znázorněna na **obrázku 8**.



Obrázek 8: Schématické znázornění vazby inzulinu, IGF-2 a IGF-1 k jednotlivým receptorům. IR-A – izoforma A inzulinového receptoru; IR-B – izoforma B inzulinového receptoru; IGF-1R – IGF-1 receptor; IGF-1R/IR-A a IGF-1R/IR-B – hybridní formy IGF-1 receptoru a příslušné izoformy inzulinového receptoru. Převzato a upraveno dle¹⁰³.

1.8 Analogy inzulinu a inzulinu podobných růstových faktorů

Analogy inzulinu a inzulinu podobných růstových faktorů jsou připravovány za účelem lépe porozumět vlastnostem těchto peptidů a jejich interakci s receptory¹⁰⁴⁻¹⁰⁹, případně vytvořit látky s vlastnostmi vylepšenými, které mohou být použity v klinické praxi¹¹⁰⁻¹¹³.

Do klinické praxe byly dosud uvedeny dva typy analogů inzulinu. Analogy s rychlým nástupem účinku umožňují diabetickým pacientům akutně navýšit množství aktivního inzulinu v krvi po příjmu potravy (inzulin lispro¹¹⁰, glulisin¹¹¹). Oproti tomu

analogy s prodlouženým poločasem života mají tu výhodu, že zůstávají v aktivní koncentraci v krvi po delší dobu než přirozený inzulin a stačí je proto pacientům podávat méně často (inzulin glargin¹¹², inzulin detemir¹¹³).

V minulosti byla připravena rovněž řada analogů IGF-1 a IGF-2^{106, 107}, které pomáhají objasnit vlastnosti zmíněných látek. Na základě analogů bylo mimo jiné zjištěno, že přítomnost Arg36 a Arg37 ve struktuře IGF-1 (viz **obr. 2**, str. 9) je pravděpodobně nutná pro aktivaci IGF-1 receptoru a spuštění jeho následných funkcí. Analog IGF-1, ve kterém byly tyto aminokyseliny zaměněny za kyselinu glutamovou, se sice vázal k IGF-1R, nebyla však pozorována fosforylace receptoru ani aktivace proteinů Akt a Erk¹⁰⁵. Podle Saegusy a spol.¹¹⁴ a Fujity a spol.¹⁰⁵ je pro správnou aktivaci receptoru stěžejní vznik ternárního komplexu IGF-1R – IGF-1 – integrin $\alpha\beta 3$, přičemž interakce mezi IGF-1 a integrinem $\alpha\beta 3$ je zprostředkována právě pomocí Arg36 a Arg37 ve struktuře IGF-1.

Přítomnost dvou argininů (Arg36 a Arg37) vedle sebe v C-doméně IGF-1 evokuje možnost proteolytického štěpení této vazby a tudíž i možnost regulace aktivity hormonu. Tuto hypotézu podporuje výzkum, v rámci kterého byla v krystalové struktuře IGF-1 pozorována chybějící elektronová hustota v oblasti, kde se oba argininy vyskytují¹¹⁵. Molekula IGF-1 rozštěpená mezi Arg36 a Arg37 byla rovněž detekována v lidské plazmě¹¹⁶. Tato pozorování nás vedla k pokusu připravit dvouřetězcový analog IGF-1 a charakterizovat jeho vlastnosti.

2 CÍL PRÁCE

- 1) Syntéza dvouřetězcového analogu IGF-1 (MC2)
- 2) Stanovení vazebných afinit analogu MC2 vůči IGF-1R a IR-A a IGF-1, IGF-2 a lidského inzulinu vůči IGF-1R, IR-A a IR-B
- 3) Studium stimulace IGF-1R pomocí analogu MC2
- 4) Studium stimulace IGF-1R, IR-A a IR-B pomocí IGF-1, IGF-2 a lidského inzulinu

3 MATERIÁL

3.1 Chemický materiál

| | |
|--|------------------------|
| Fetální hovězí sérum | Gibco, USA |
| Fmoc-chráněné aminokyseliny | Novabiochem, Švýcarsko |
| Glukosa | Sigma, USA |
| HEPES | Sigma, USA |
| Hovězí sérový albumin | Invitrogen, USA |
| Chemiluminiscenční substrát Supersignal® West | |
| FEMTO Max. Sensitivity Substrate | Pierce, USA |
| Inhibitory proteas – Protease Inhibitor Cocktail (P8340) | Sigma-Aldrich, Německo |
| L-glutamin | Gibco, USA |
| Lidský inzulin | Sigma, USA |
| Lidský inzulin značený radioizotopem ^{125}I | Perkin Elmer, USA |
| Lidský IGF-1 | Tercica, USA |
| Lidský IGF-1 značený radioizotopem ^{125}I | Perkin Elmer, USA |
| Lidský IGF-2 | Sigma, USA |
| Médium DMEM | Gibco, USA |
| Puromycin | Gibco, USA |
| PVDF membrána | Millipore, USA |
| Roztok na vymývání protilátek z membrán Restore | |
| Western Blot Stripping Buffer | Pierce, USA |
| Sephadex G10, Sephadex G50 | Pharmacia, Švédsko |
| Wangova pryskyřice Fmoc-Arg/Ala(tBu) - Wang Resin | Novabiochem, Švýcarsko |

Použité protilátky jsou uvedeny v **tabulce 1** na str. 24.

Ostatní běžné chemikálie byly dodány firmami Sigma (USA), Fluka (Švýcarsko), Invitrogen (USA) či Thermo Scientific (USA).

Při přípravě pufrů byla používána deionizovaná voda MilliQ.

Tabulka 1: Primární a sekundární protilátky použité k detekci proteinů. Tabulka obsahuje informace o protilátkách (protein či konkrétnější struktura, kterou protilátka detekuje, název protilátky, dodavatel, použité ředění v 3% BSA v T-TBS, organizmus původu protilátky) a o oblasti molekulové hmotnosti, ve které byly dané proteiny detekovány (v případě protilátek primárních).

| Detekovaný protein/struktura | Název protilátky | Ředění | Organismus původu | Oblast Mr |
|--|--|---------|-------------------|-----------|
| Primární protilátky detekující fosforylaci proteinu | | | | |
| pAkt | Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) Rabbit mAb Cell Signaling Technology, USA | 1:1000 | Králík | < 75 kDa |
| pErk | Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb Cell Signaling Technology, USA | 1:2000 | Myš | < 75 kDa |
| pTyr 1131 IGF-1R pTyr 1158 IR | Phospho-IGF-1 Receptor β (Tyr1131)/Insulin Receptor β (Tyr1146) Antibody Cell Signaling Technology, USA | 1:1000 | Králík | > 75 kDa |
| pTyr 1135/1136 IGF-1R pTyr 1162/1163 IR | Phospho-IGF-1 Receptor β (Tyr1135/1136)/Insulin Receptor β (Tyr1150/1151) (19H7) Rabbit mAb Cell Signaling Technology, USA | 1:1000 | Králík | > 75 kDa |
| pTyr (blíže nespecifikovaný) | Anti-Phosphotyrosine Antibody, clone 4G10 Millipore, USA | 1:2000 | Myš | > 75 kDa |
| Kontrolní primární protilátky (detekující celkový obsah proteinu) | | | | |
| Aktin | Anti-Actin (20-33), IgG Fraction of Antiserum Sigma-Aldrich, Německo | 1:2000 | Králík | < 75 kDa |
| β-podjednotka IGF-1R | IGF-1R β (C-20): sc-713 Santa Cruz Biotechnology, USA | 1:200 | Králík | > 75 kDa |
| β-podjednotka IR | Mouse (monoclonal) Anti-Human Insulin Receptor (β -Subunit) Invitrogen, USA | 1:200 | Myš | > 75 kDa |
| Akt | Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb Cell Signaling Technology, USA | 1:1000 | Králík | < 75 kDa |
| Erk | p44/42 MAPK (Erk 1/2) (3A7) Mouse mAb Cell Signaling Technology, USA | 1:2000 | Myš | < 75 kDa |
| Sekundární protilátky | | | | |
| Protilátka zaměřená proti primárním protilátkám králičího původu | Anti-Rabbit IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in goat Sigma-Aldrich, Německo | 1:80000 | Koza | |
| Protilátka zaměřená proti primárním protilátkám myšího původu | Anti-Mouse IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in rabbit Sigma-Aldrich, Německo | 1:2000 | Králík | |

3.2 Biologický materiál

| | |
|------------------------------------|---|
| Buněčná linie R ⁺³⁹ | Darována prof. A. Belfiozem, Univerzita Catanzaro, Itálie |
| Buněčná linie R ⁻ /IR-A | Darována prof. A. Belfiozem, Univerzita Catanzaro, Itálie |
| Buněčná linie R ⁻ /IR-B | Darována prof. A. Belfiozem, Univerzita Catanzaro, Itálie |
| Buněčná linie IM-9 | ATCC, USA |

3.3 Použité přístroje

| | |
|---|-------------------------------|
| Automatizovaný syntetizátor peptidů ABI 433A | Applied Biosystems, USA |
| CCD kamera ChemiDoc MP Imaging System | Bio-Rad, USA |
| Centrifuga Hettich Universal 320 | Schoeller, Německo |
| Centrifuga Trigon Plus | Jouan, USA |
| Hmotnostní analyzátor LTQ Orbitrap XL | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Inkubátor CO ₂ Incubator MCO 18 AIC | Sanyo, Japonsko |
| Kolona na HPLC Luna C18 | Phenomenex, USA |
| Kolona na HPLC Vydac C4 (214TP54) | Fisher Scientific, USA |
| Kolona na HPLC Vydac C4 (214TP510) | Fisher Scientific, USA |
| Mikroskop Axiovert 40 CFL | Zeiss, Německo |
| Peristaltická pumpa Minipus 3 | Gilson, USA |
| Přístroje na HPLC - čerpadlo Waters 600 a UV/VIS detektor Waters 2487 | Waters, USA |
| Přístroj na měření radioaktivity Wizard 1470 Automatic Gamma Counter | Perkin Elmer, USA |

| | |
|--|---------------|
| Spektrofotometr 6105 U.V/VIS. Spectrophotometer | Jenway, UK |
| Ultrazvukový homogenizátor Elmasonic S 30 | Elma, Německo |
| Zařízení pro přenos proteinů z gelu na membránu Trans Blot SD Cell | Bio-Rad, USA |
| Zdroj pro elektroforézu a přenos proteinů z gelu na membránu POWER PAC 1000 | Bio-Rad, USA |

4 METODY

4.1 Syntéza dvouřetězcového analogu IGF-1 (MC2)

Dvouřetězcový analog IGF-1 (dále MC2) byl připraven rekombinací dvou částí řetězce IGF-1, konkrétně řetězců o aminokyselinách 1-36 (dále M) a 37-70 (dále N). Jedná se o analog, který se sekvenčně neliší od IGF-1, chybí však peptidová vazba mezi Arg36 a Arg37 (aminokyselinová sekvence IGF-1 je znázorněna na **obrázku 2**, str. 9).

4.1.1 Syntéza aminokyselinových řetězců

Řetězce M a N byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi dle Merrifielda¹¹⁷ laboratoří Medicinální chemie ÚOCHB AV ČR. Použit byl automatizovaný syntetizátor ABI 433A (Applied Biosystems). Jako pevná fáze byla použita předem substituovaná (argininem v případě řetězce M a alaninem v případě řetězce N) Wangova pryskyřice (Novabiochem). K chránění α -aminoskupin aminokyselin bylo využito 9-fluorenyl-methyloxykarbonyl skupiny (Fmoc), odštěpitelné v bazickém prostředí. K ochraně funkčních skupin postranních řetězců byla použita *terc*-butyloxykarbonylová (Boc), *terc*-butylová (tBu) a tritylová (Trt) skupina.

Každý cyklus syntézy trval 30 min a byl proveden jednou až dvakrát. V každém cyklu byl přidán 10-ti násobek potřebného množství dané chráněné aminokyseliny. Jako kondenzační činidlo byl použit 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU), N-hydroxybenzotriazol (HOBt) a *N,N*-diizopropylethylamin (Dipea) v dimethylformamidu (DMF). Po dokončení syntézy byla pryskyřice s navázaným peptidem promyta a vysušena dichlormethanem (DCM) a předána naší laboratoři.

4.1.2 Štěpení řetězců z pevné fáze

Štěpení řetězců M a N od pevné fáze bylo provedeno roztokem připraveným podle **tabulky 2** (str. 28).

Tabulka 2: Chemikálie použité k přípravě roztoku pro štěpení peptidu od pevné fáze a jejich množství. TFA – kyselina trifluoroctová, EDT – ethandithiol, TIS – triizopropylsilan.

| Chemikálie | Množství |
|------------------|--------------|
| 100% TFA | 88,3 % (v/v) |
| H ₂ O | 3,2 % (v/v) |
| Thioanizol | 3,2 % (v/v) |
| EDT | 1,6 % (v/v) |
| Fenol | 3,2 % (w/v) |
| TIS | 0,6% (v/v) |

Štěpící roztok (24 ml na 100 μ mol peptidu) byl přidán k peptidu na pevné fázi. Směs byla 2 hodiny míchána za laboratorní teploty a poté za stálého chlazení přefiltrována přes fritu velikosti S3 do ledového diethyletheru (200 ml diethyletheru na 100 μ mol peptidu). Frita byla 2x propláchnuta studenou 100% kyselinou trifluoroctovou (TFA). Vzniklá sraženina peptidu v diethyletheru byla přefiltrována přes fritu velikosti S4. Frita byla 4x propláchnuta ledovým diethyletherem a sraženina na fritě byla následně vysušena.

4.1.3 S-sulfonace

Z důvodu zamezení spontánnímu vzniku disulfidických vazeb v rámci jednotlivých řetězců byly thiolové skupiny (-SH) cysteinů v řetězcích převedeny na skupiny S-sulfonátové (-S-SO₃H) s využitím siřičitanu sodného jako sulfonačního činidla.

Sraženina řetězce M či N byla rozpuštěna v sulfitolizačním pufru o pH 8,6 a složení 0,1M tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris), 0,25M siřičitan sodný, 0,08M tetrathionan sodný a 7M guanidin hydrochlorid (množství pufru cca 25 ml na 100 μ mol peptidu). Směs byla po dobu 3 hodin inkubována při laboratorní teplotě za stálého míchání. Poté byly jednotlivé řetězce odsoleny a částečně purifikovány metodou gelové chromatografie (viz kapitola 4.1.5, str. 29).

4.1.4 Rekombinace

Rekombinace byla provedena za účelem spojení aminokyselinových řetězců M a N disulfidickými vazbami, správného sbalení peptidu a tím vzniku cílového IGF-1 analogu MC2.

M a N byly zvlášť rozpuštěny v odvzdušněném pufru o složení 0,1M Gly/NaOH (pH 10,5). Pomocí A_{280} byly určeny koncentrace M a N v roztocích a následně počet jim odpovídajících S-sulfonátových skupin (**M**: $\epsilon = 1990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_r = 4149,7$; 4 mol $-\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$ skupin/mol M; **N**: $\epsilon = 3230 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_r = 4003,3$; 2 mol $-\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$ skupin/mol N). Extinční koeficienty byly určeny ze vztahu $\epsilon_{280} = (n_Y \cdot 1280) + (n_C \cdot 120)$, kde n_Y je počet tyrosinů a n_C počet cysteinů v molekule.

M a N byly smíchány v poměru 1:2 a do roztoku byl přidán dithiothreitol (DTT), a to 1,1 ekvivalentu $-\text{SH}$ skupin obsažených v DTT na 1 ekvivalent $-\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$ skupin vyskytujících se v roztoku. Po 15 minutách byl přidán zavzdušněný pufr (0,1M Gly/NaOH, pH 10,5) tak, aby konečný poměr mezi pufrem odvzdušněným a zavzdušněným byl 2:3.

Takto připravený roztok byl po dobu 3 dnů ponechán v chladu (4°C) za přístupu vzdušného kyslíku za účelem rekombinace $-\text{SH}$ skupin mezi řetězci. Poté byla reakce zastavena přidávkem 99% kyseliny octové v takovém množství, aby produkty rekombinace prošly izoelektrickým bodem (tzn. aby v roztoku vznikl a opět zmizel zákal). Výsledná směs byla odsolena a přečištěna metodou gelové chromatografie (viz kapitola 4.1.5).

4.1.5 Gelová chromatografie

Metoda gelové chromatografie byla využita za účelem prvotního přečištění jednotlivých řetězců (M či N) po S-sulfonaci a cílového produktu rekombinace MC2. V případě řetězců byla použita kolona Sephadex G10 o objemu 1000 ml. Mobilní fázi tvořil 50 mM roztok hydrogenuhličitanu amonného o průtokové rychlosti 0,7 ml/min. Frakce byly jímány v 15 minutových intervalech. V případě produktů rekombinace byla použita kolona Sephadex G50 o objemu 500 ml a mobilní fázi tvořila 1M kyselina octová o průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Frakce byly jímány v 12 minutových intervalech. Gelová chromatografie byla prováděna při laboratorní teplotě. Průtoková

rychlost mobilní fáze byla udržována na stálé hodnotě pomocí peristaltické pumpy Miniplus 3 (Gilson).

U jednotlivých frakcí byla určena absorpance při vlnové délce 276 nm a na základě získaných údajů byly vybrány frakce, ve kterých se vyskytují látky s Mr odpovídající příslušnému aminokyselinovému řetězci (M či N) či analogu MC2. Vybrané frakce byly ve všech případech spojeny do jednoho roztoku, lyofilizovány (Heto FD3 Freeze Dryer) a podrobeny další purifikaci pomocí RP-HPLC.

4.1.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC, z angl. reverse phase high-performance liquid chromatography) je metoda využívající rozdílných sil interakce jednotlivých látek obsažených v dělené směsi s nepolární stacionární fází. RP-HPLC byla provedena za účelem konečné izolace aminokyselinových řetězců (M či N) a analogu MC2. Ke stanovení čistoty řetězců M a N bylo využito analytického provedení RP-HPLC. Použity byly přístroje firmy Waters (čerpadlo Waters 600 a UV/VIS detektor Waters 2487). Získaná data byla zpracována programem Clarity Lite (Data Apex).

Za účelem izolace byly vybrané frakce gelové chromatografie po lyofilizaci rozpuštěny v 16% (v/v) acetonitrilu (ACN) v 0,1% (v/v) TFA v případě řetězce M a analogu MC2 a v 40% ACN v 0,1% TFA v případě řetězce N. V případě izolace řetězců M a N byla použita preparativní kolona Luna C18 (Phenomenex) o rozměrech 150 x 4,6 mm, v případě izolace analogu MC2 semipreparativní kolona Vydac C4 (214TP510) (Fisher Scientific) o rozměrech 250 x 10 mm. Mobilní fázi tvořil roztok o gradientu koncentrace ACN v 0,1% TFA (konkrétní použité gradienty jsou uvedeny v **tabulce 3**, str. 31). Průtok mobilní fáze byl nastaven na hodnotu 9 ml/min v případě izolace obou řetězců a 4 ml/min v případě izolace IGF-1 analogu MC2.

Čistota řetězců M a N po převedení thiolových skupin na skupiny S-sulfonátové byla stanovena provedením RP-HPLC na analytické koloně Vydac C4 (214TP54) (Fisher Scientific) o rozměrech 250 x 4,6 mm. Mobilní fázi tvořil roztok o gradientu koncentrace ACN v 0,1% TFA (viz **tabulka 3**, str. 31) o průtoku 1 ml/min.

Tabulka 3: Gradienty ACN použité k izolaci aminokyselinových řetězců M a N a IGF-1 analogu MC2 a ke stanovení čistoty řetězců M a N pomocí RP- HPLC. Použitý ACN byl rozpuštěn v 0,1M TFA.

| RP-HPLC provedené za účelem izolace látek | | | | | | | | |
|---|---------------------|----|----|----|----|------|----|--|
| M | Čas [min] | 0 | 10 | 30 | 31 | 33 | 34 | |
| | Obsah ACN [% (v/v)] | 33 | 33 | 37 | 80 | 80 | 33 | |
| N | Čas [min] | 0 | 30 | 31 | 33 | 34 | | |
| | Obsah ACN [% (v/v)] | 27 | 38 | 80 | 80 | 27 | | |
| MC2 | Čas [min] | 0 | 1 | 36 | 37 | 37,1 | | |
| | Obsah ACN [% (v/v)] | 8 | 27 | 80 | 80 | 8 | | |
| RP-HPLC provedené za účelem stanovení čistoty látek | | | | | | | | |
| M a N | Čas [min] | 0 | 30 | 31 | | | | |
| | Obsah ACN [% (v/v)] | 8 | 80 | 8 | | | | |

4.1.7 Hmotnostní spektrometrie

Peptidový obsah oblastí pod jednotlivými elučními vrcholy na chromatogramu RP-HPLC byl identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie laboratoří Hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR. K identifikaci bylo využito přístroje LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) a metody ionizace elektronovým sprejem (ESI, z angl. electrospray ionization) v negativním módu v případě analýzy aminokyselinových řetězců a v pozitivním módu v případě analýzy produktů rekombinace.

4.2 Stanovení vazebné afinity IGF-1, IGF-2, MC2 a inzulinu vůči IGF-1R a IR

Testování vazebné afinity je založeno na kompetici mezi zkoumaným ligandem a vysokoafinitním ligandem značeným radioaktivním izotopem ^{125}I o vazebné místo na příslušném receptoru. V případě testování vazebných afinit ligandů vůči IGF-1R byl použit radioaktivně značený IGF-1 a v případě testování vazebných afinit vůči IR-A a IR-B byl použit radioaktivně značený lidský inzulin. Ke stanovení vazebných afinit ligandů vůči IGF-1 receptoru byla použita buněčná linie R⁺³⁹ (myší embryonální fibroblasty s vyřazeným genem pro IGF-1R a vloženým genem pro IGF-1R lidský). Ke stanovení vazebných afinit ligandů vůči IR-A byla použita buněčná linie IM-9

(lidské B-lymfoblasty transformované virem Eppstein-Barrové odvozené z mnohočetného myelomu) a ke stanovení vazebných afinit vůči IR-B byla použita buněčná linie R⁻/IR-B (myší embryonální fibroblasty s vyřazeným genem pro IGF-1R a vloženým genem pro lidský IR-B).

Experiment byl v případě práce s buněčnou linií IM-9 proveden metodou dle De Meytse¹¹⁸, v případě buněčných linií R⁺³⁹ a R⁻/IR-B bylo využito postupy dle Frascy a spol.⁴⁶. V obou případech byla použita stálá koncentrace buněk a radioaktivně značeného ligandu a rostoucí koncentrace testovaného ligandu.

4.2.1 Stanovení vazebné afinity ligandů vůči IGF-1R a IR-B

Vazebná afinita vůči IGF-1R byla testována pro IGF-1, IGF-2, MC2 a lidský inzulin (HI). Vazebná afinita vůči IR-B byla stanovena pro IGF-1, IGF-2 a HI.

Buňky byly po dobu 2 až 3 dnů kultivovány na destičkách o 24 jamkách v médiu DMEM s 10% fetálním hovězím sérem (FBS), penicilinem a streptomycinem (100 IU/ml), puromycinem (0,3 μ l/ml) a glutaminem (200 mmol/ml) v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou při teplotě 37°C. Poté bylo médium odsáto a každá jamka byla 2x promyta 300 μ l vazebného pufru (100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM KCl; 1,3 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM glukosa, 15 mM octan sodný a 1% BSA; pH 7,6).

Reakční směs byla tvořena buňkami v jamce (cca 21 tisíc buněk na jamku v případě buněčné linie R⁺³⁹ a cca 38 tisíc buněk na jamku v případě buněčné linie R⁻/IR-B), testovaným ligandem o různých koncentracích, radioaktivně značeným ligandem o stálé koncentraci (0,039 nM, 44 000 cpm, K_d = 0,2 nM v případě IGF-1 a 0,043 nM, 43000 cpm, K_d = 0,3 nM, v případě HI) a vazebným puftrem. Konečný objem každé reakční směsi byl 250 μ l, přičemž každý vzorek byl připraven v duplikátech. Reakce probíhala při teplotě 4°C po dobu 16 hodin v případě práce s buněčnou linií R⁺³⁹ a po dobu 3 hodin v případě práce s buněčnou linií R⁻/IR-B. Následně byla každá jamka 2x promyta 300 μ l vazebného pufru. Reakce byla zastavena přidávkou 300 μ l 0,1M NaOH. Po 15 minutách byl obsah každé jamky přenesen do zkumavky. Jamky byly opětovně vymyty 200 μ l 0,1M NaOH, přičemž obsah každé jamky byl přidán do příslušné zkumavky. Následně byla za pomoci γ -počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer) změřena radioaktivita každého

ze vzorků. Doba měření jednoho vzorku byla 1 minuta. Data byla analyzována programem GraphPad Prism 5.0 metodou nelineární regrese podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (z angl. one-site fitting model), přičemž byla brána v úvahu případná deplece ligandu.

Případné odchylky v počtu buněk mezi jednotlivými destičkami byly eliminovány vztažením hodnot získaných z každé destičky k 100% hodnotě získané z jamek dané destičky obsahujících pouze buňky a radioaktivně značený ligand, nikoliv ligand testovaný.

4.2.2 Stanovení vazebné afinity ligandů vůči IR-A

Vazebná afinita vůči IR-A byla testována pro IGF-1, IGF-2, MC2 a HI. Každá reakční směs byla tvořena buňkami o koncentraci 2 miliony/ml, ^{125}I -inzulinem o stálé koncentraci (0,01 nM, 20 000 cpm; $K_d = 0,3$ nM), testovaným ligandem o různých koncentracích a vazebným pufrům (složení shodné jako při testování vazebných afinit ligandů k IGF-1R a IR-B, viz **kapitola 4.2.1**, str. 32). Konečný objem reakční směsi byl vždy 500 μl . Reakce probíhala při 15°C po dobu 150 minut, přičemž každých 30 minut byly reakční směsi promíchány. Následně byly z každé směsi s danou koncentrací testovaného ligandu vytvořeny duplikáty o objemu 200 μl . Reakce byla zastavena přidáním 200 μl vazebného pufru o teplotě 4°C ke každému z duplikátů. Takto připravené vzorky byly po dobu 10 minut centrifugovány při 15 000 x g a 4°C. Po odsátí supernatantu byla měřena radioaktivita pelety pomocí γ -počítače. Doba měření jednoho vzorku byla 10 minut. Data byla vyhodnocena za použití modelu vazby do jednoho vazebného místa pomocí programu vytvořeného v aplikaci Excel a vyvinutého v laboratoři Pierre de Meytse v Dánsku.

4.3 Studium aktivace IGF-1R a IR a následné signalizace zprostředkované IGF-1, IGF-2, MC2 a inzulinem

4.3.1 Pěstování buněk

Byly používány buněčné linie R^{+39} , $\text{R}^-/\text{IR-A}$ a $\text{R}^-/\text{IR-B}$. Jedná se o myší embryonální fibroblasty s vyřazeným genem pro IGF-1R, do kterých byl vložen gen pro

příslušný lidský receptor (IGF-1R v případě linie R⁺³⁹, IR-A v případě linie R⁻/IR-A a IR-B v případě linie R⁻/IR-B). Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s 10% FBS, penicilinem a streptomycinem (100 IU/ml), puromycinem (0,3 µl/ml) a glutaminem (200 mmol/ml) v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou při teplotě 37°C a následně nasazeny na destičky o 24 jamkách, vždy po 15 tisících buněk na jamku v případě linie R⁺³⁹ a 10 tisících buněk na jamku v případě linií R⁻/IR-A a R⁻/IR-B. Po 24 hodinách bylo médium s FBS nahrazeno médiem bezsérovým, ve kterém byly buňky v inkubátoru kultivovány dalších 20 hodin.

4.3.2 Ředění roztoků ligandů pro stimulaci buněk

Roztoky IGF-1, IGF-2, HI a analogu MC2 byly naředěny v bezsérovém médiu na koncentrace 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM a 100 nM. Přesné koncentrace byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm s vypočítanými extinčními koeficienty 4560 M⁻¹cm⁻¹ pro IGF-1, IGF-2 a dvouřetězcový analog MC2 a 5840 M⁻¹cm⁻¹ pro lidský inzulin. Extinční koeficienty byly určeny ze vztahu $\varepsilon_{280} = (nY \cdot 1280) + (nC \cdot 120)$, kde nY je počet tyrosinů a nC počet cysteinů v molekule.

4.3.3 Stimulace IGF-1R a obou izoform IR různými ligandy

4.3.3.1 Stimulace IGF-1R různými ligandy

Za účelem stimulace IGF-1 receptoru byla použita buněčná linie R⁺³⁹. Buňky byly stimulovány pomocí roztoků IGF-1, IGF-2, HI a MC2, a to po dobu 5, 10, 15, 20, 30, 40 a 60 min.

V případě 5, 15, 30, 40 a 60 minut byly roztoky všech peptidů použity v 5 různých koncentracích (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM a 100 nM). V případě 10 a 20 minut bylo použito 7 různých koncentrací (0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM a 100 nM). Stimulace receptorů byla zastavena pomocí vakuového odsátí roztoků, opláchnutí fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) a zalití kapalným dusíkem. Buňky na destičkách byly následně uchovávány na suchém ledu. Obsah jedné kontrolní

jamky (nulová koncentrace peptidu) z každé destičky byl použit k určení počtu rozmnožených buněk a koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové¹¹⁹.

4.3.3.2 Stimulace IR-A a IR-B různými ligandy

Za účelem stimulace IR-A byla použita buněčná linie R⁻/IR-A. Za účelem stimulace IR-B byla použita buněčná linie R⁻/IR-B. Buňky byly stimulovány pomocí roztoků IGF-1, IGF-2 a HI, a to po dobu 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minut. Použito bylo 5 různých koncentrací každého z peptidů (0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM a 100 nM). Zastavení stimulace receptorů probíhalo stejným způsobem jako v případě buněčné linie R⁺³⁹ (viz **kapitola 4.3.3.1**, str. 34). Obsah jedné kontrolní jamky z každé destičky byl opět použit k určení počtu rozmnožených buněk a koncentrace proteinů.

4.3.4 Příprava lyzátů buněk pro elektroforetickou separaci v přítomnosti SDS

K buňkám v každé jamce bylo přidáno 100 μ l vzorkového pufru pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) s přidáním inhibitory proteas a fosfatas (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS (w/v); 10% glycerol (v/v); 0,01% bromfenolová modř (w/v); 0,1M DTT (w/v); 50 mM NaF; 1mM Na₃VO₄; 0,5% inhibitory proteas). Následně byly buňky 1 minutu lyzovány pomocí ultrazvuku. Takto připravené vzorky pro SDS-elektroforézu byly přeneseny do mikrozkušavek a uchovávány při teplotě -20°C.

4.3.5 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS

Elektroforetická separace proteinů z buněčných lyzátů probíhala standardním způsobem v 10% polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS. Do jednotlivých komůrek gelu byly nanášeny vzorky s množstvím proteinů uvedeným v **tabulce 4** (str. 36).

Tabulka 4: Množství proteinů ve vzorcích nanášených do komůrek polyakrylamidových gelů za účelem provedení SDS-elektroforézy.

| Množství proteinů [μg/komůrka gelu] | Buněčná linie |
|--|----------------------|
| 3.20 ± 0,38 | R ⁺³⁹ |
| 3,65 ± 0,50 | R ⁻ /IR-A |
| 3,44 ± 0,40 | R ⁻ /IR-B |

Elektroforetické dělení bylo prováděno v prostředí 0,025M Tris/0,192M glycinového elektrodového pufru s 0,01% (w/v) SDS. Elektrický proud byl limitován hodnotou 24 mA/gel. Elektroforéza probíhala 10 minut při počátečním napětí 100 V, poté byla hodnota napětí zvýšena na 200 V, přičemž celková doba elektroforetické separace byla asi 1 hodina.

4.3.6 Imunochemická detekce proteinů

Proteiny z gelu byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu pomocí tzv. metody přenosu (angl. „blotting“). Po dokončení elektroforetické separace byly gely po 30 minut ponechány v pufru pro přenos (20 mM Tris, 189 mM glycin, 10% methanol (v/v), 0,1% SDS (w/v)). PVDF membrány byly po dobu 15 sekund aktivovány v methanolu, opláchnuty deionizovanou vodou a následně po dobu 10 minut ponechány v pufru pro přenos. Filtrační papíry byly taktéž nasáknuty puftrem pro přenos a následně byl sestaven „přenosový sendvič“. Přenos probíhal 75 minut v přístroji pro polosuchý přenos při konstantním napětí 12 V, limitní proud byl nastaven na 1,5 mA/cm².

Membrány byly po dokončení přenosu podélně rozstříhnuty v oblasti molekulové hmotnosti 75 kDa a přes noc ponechány v 3% BSA v T-TBS (20 mM Tris/Cl⁻ (pH 7,5) 140 mM NaCl; 0,1% Tween-20 (v/v)) při teplotě 4°C. Každá z obou částí membrány byla následně samostatně použita k detekci různých proteinů. Gely byly ponechány v barvicím roztoku Coomassie Brilliant Blue (12,7% (v/v) H₃PO₄ (85%), 11% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 22,2% (v/v) MetOH, 0,13% (w/v) Coomassie G-250).

Membrány byly 3x po dobu 5 minut opláchnuty T-TBS a 60 minut inkubovány s primární protilátkou. Následně byly opět 3x 5 minut opláchnuty T-TBS a 60 minut inkubovány s vhodnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou

peroxidasou. Po dokončení inkubace byly membrány 3x 5 a 1x 10 minut opláchnuty T-TBS. Primární protilátky detekující fosforylaci proteinů (či kontrolní protilátky detekující celkový obsah proteinu), oblast Mr, tedy část membrány, na které byly tyto protilátky detekovány, a sekundární protilátky použité v experimentech jsou uvedeny v *tabulce 1* (str. 24).

Stejné membrány byly použity k detekci více proteinů. Vícenásobná detekce byla umožněna použitím vymývacího pufru „Restore Western Blot Stripping Buffer“ (Pierce). Membrány byly ve vymývacím pufru inkubovány 20 minut, případná odhalená místa na membráně byla opět zablokována 3% BSA v T-TBS (inkubace 30 minut).

Pro detekci signálu byl použit chemiluminiscenční substrát „Supersignal[®] West FEMTO Max. Sensitivity Substrate“ (Pierce). Chemiluminiscence byla detekována pomocí CCD kamery ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Intenzita proužků byla kvantifikována v programu Image-Lab[™] Software, který je součástí ovládacího systému kamery.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava analogu MC2

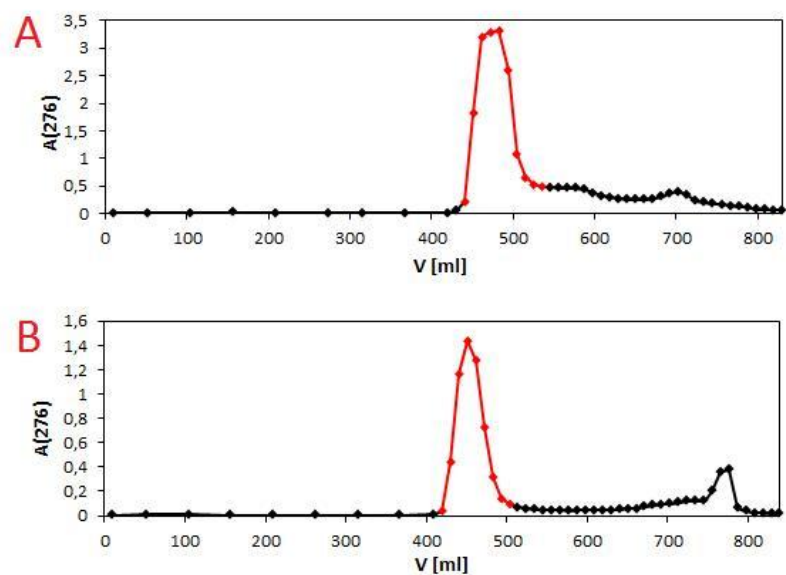
Dvouřetězcový analog IGF-1 (MC2), tedy analog, který se sekvenčně neliší od IGF-1, neobsahuje však peptidovou vazbu mezi Arg36 a Arg37, byl připraven rekombinací řetězců M (řetězec o aminokyselinách 1-36 sekvence IGF-1) a N (řetězec o aminokyselinách 37-70 sekvence IGF-1).

5.1.1 Příprava aminokyselinových řetězců pro následnou rekombinaci

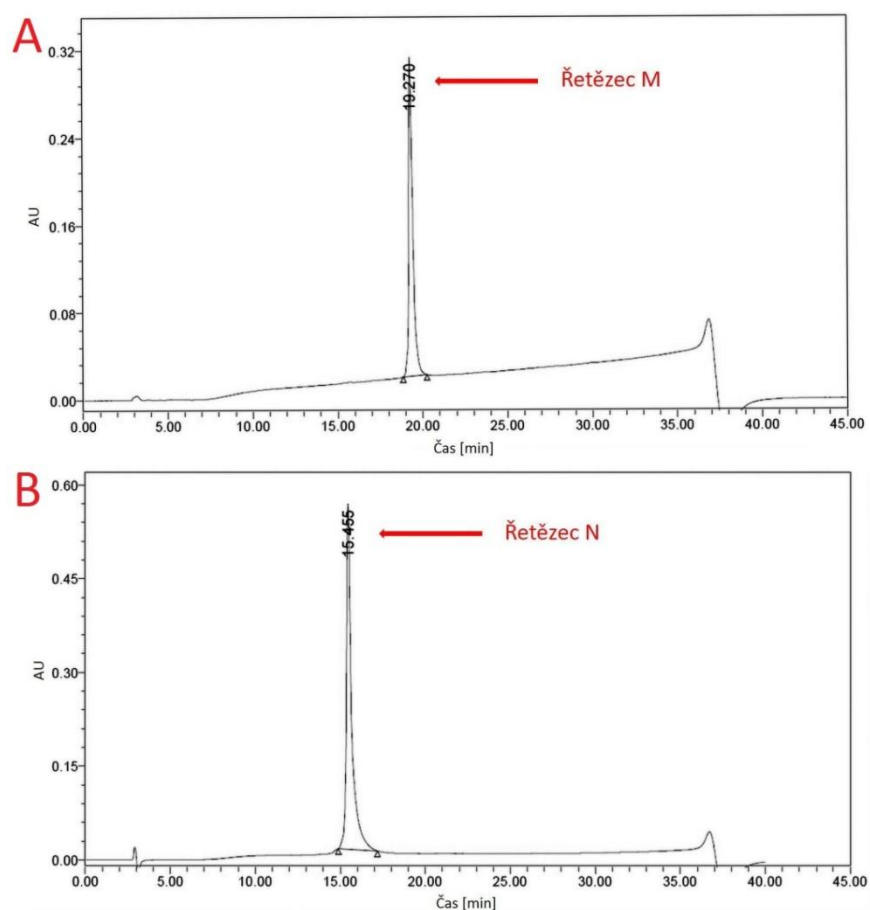
Řetězce M a N pro následnou rekombinaci byly připraveny podle popisu v **kapitolách 4.1.1 – 4.1.3, 4.1.5 a 4.1.6** (str. 27-30). Řetězce po převedení thiolových skupin na skupiny S-sulfonátové byly nejprve přečištěny metodou gelové chromatografie. Frakce obsahující látky s M_r odpovídajícími řetězcům M (tedy 4003,7) či N (tedy 4149,7) (viz **obr. 9**, str. 39) byly následně dále izolovány metodou RP-HPLC.

Čistota obou řetězců byla ověřena pomocí analytického provedení RP-HPLC tak, jak je popsáno v **kapitole 4.1.6** (str. 30). Na **obrázku 10** (str. 39) jsou zobrazeny analytické chromatogramy již přečištěných aminokyselinových řetězců M a N. Řetězec M se na chromatogramu vyskytoval v oblasti pod elučním vrcholem s retenčním časem 19,3 minut, řetězec N se vyskytoval v oblasti pod elučním vrcholem s retenčním časem 15,5 minut. Vzhledem k přítomnosti pouze jednoho elučního vrcholu na obou chromatogramech nebyly ve vzorcích detekovány žádné nečistoty.

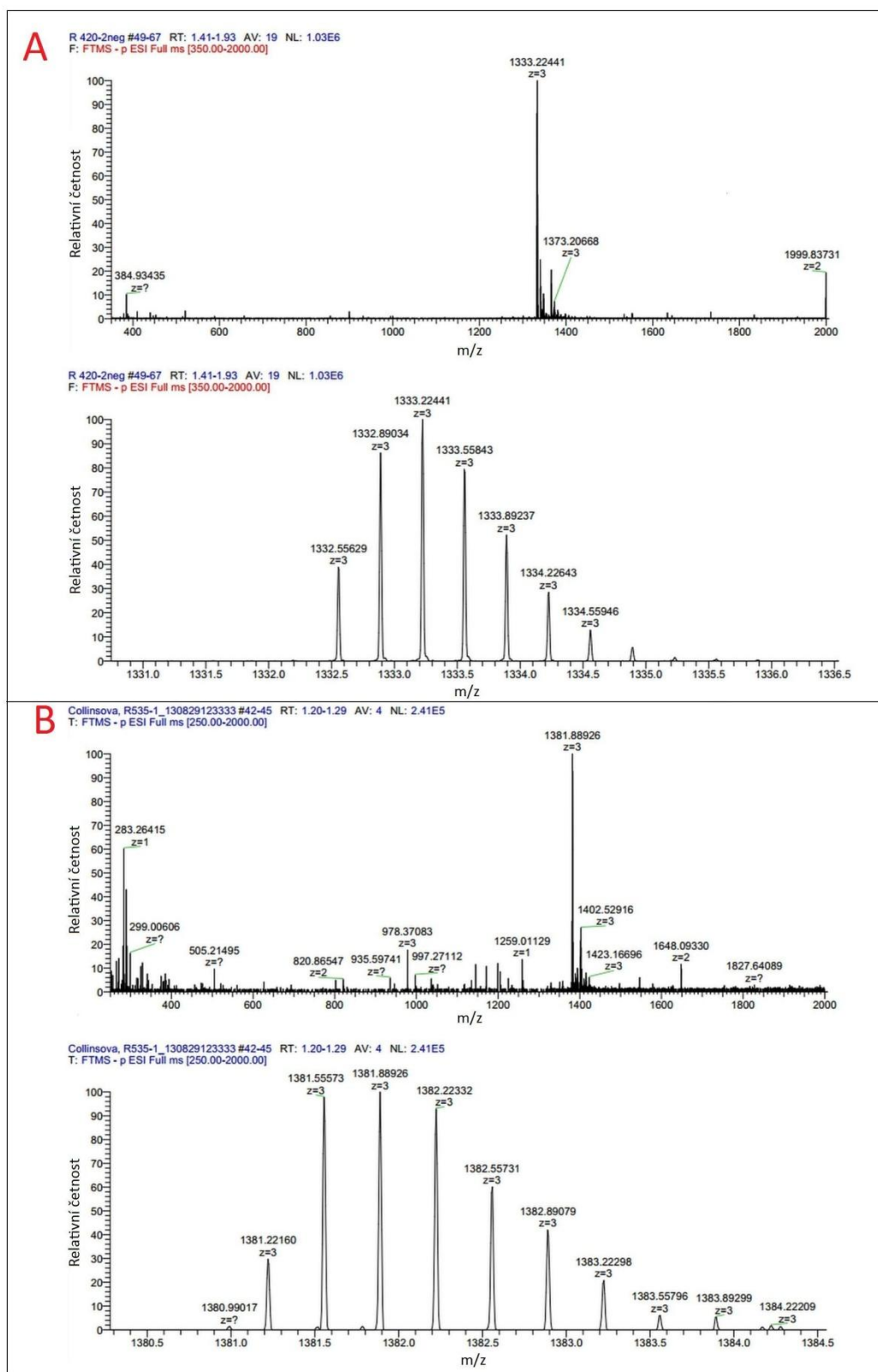
Na závěr byla přítomnost jednotlivých řetězců pod konkrétními elučními vrcholy ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie (viz **obr. 11**, str. 40).



Obrázek 9: Separace řetězce M (A) a N (B) gelovou chromatografií za použití kolony Sephadex G10 (Pharmacia). Červeně jsou vyznačeny oblasti, pod kterými se daný řetězec vyskytoval.



Obrázek 10: Chromatografická analýza čistoty řetězců M (A) a N (B) pomocí analytického provedení RP-HPLC za použití kolony Vydac C4 (214TP54) (Fisher Scientific).

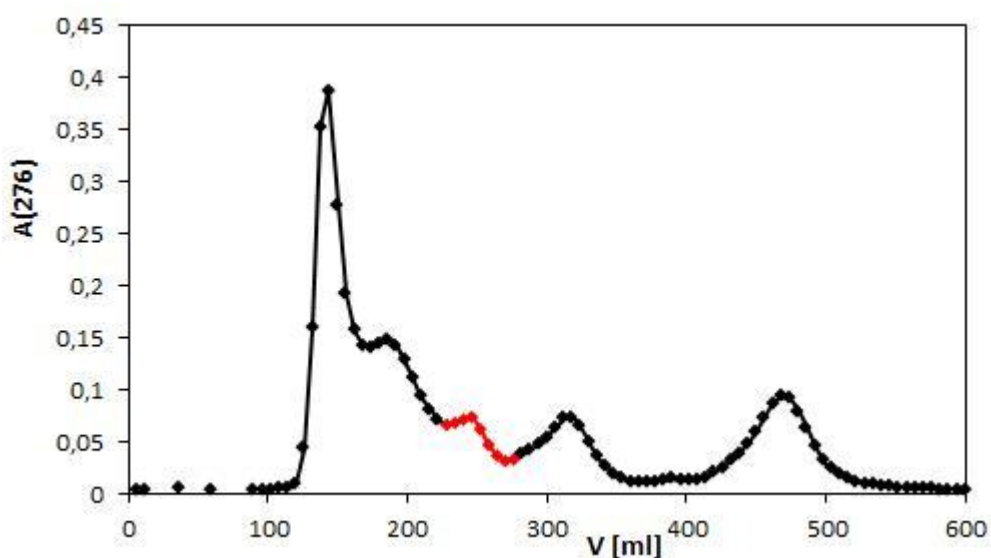


Obrázek 11: Hmotnostní spektra řetězců M (A) a N (B). Monoizotopická hmotnost řetězce M je 4000,7, relativní molekulová hmotnost je 4003,7. Monoizotopická hmotnost řetězce N je 4143,7, relativní molekulová hmotnost je 4149,7.

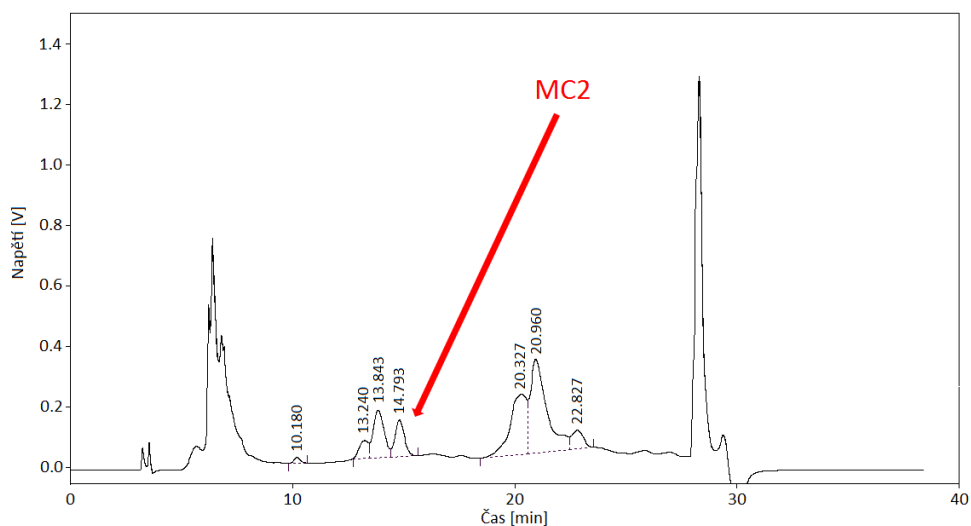
5.1.2 Purifikace a identifikace MC2

Dvouřetězcový IGF-1 analog MC2 byl připraven rekombinací dvou aminokyselinových řetězců sekvence IGF-1 (popsáno v **kapitolách 4.1.4 – 4.1.6**, str. 29-30). Gelová chromatografie byla provedena za účelem oddělit ze směsi po rekombinaci frakce obsahující látky s molekulovou hmotností odpovídající cílovému produktu MC2 (tedy frakce obsahující látky s Mr kolem 7666,6 viz **obr. 12**). Tyto frakce byly dále podrobeny purifikaci pomocí RP-HPLC (viz **obr. 13**, str 42). Cílový produkt MC2 se nacházel v oblasti pod elučním vrcholem s retenčním časem 14,8 minut. V oblasti pod elučním vrcholem s retenčním časem 13,2 minut se nacházel produkt se špatně zformovanými S-S vazbami a zároveň s Met59 v oxidované formě. V oblasti pod elučním vrcholem s retenčním časem 13,8 minut se nacházel produkt se špatně zformovanými S-S vazbami a zároveň s Met59 v neoxidované formě a produkt se správně zformovanými S-S vazbami a zároveň s Met59 v oxidované formě. Totožnost produktů rekombinace pod konkrétními elučními vrcholy získanými dělením RP-HPLC byla ověřena pomocí identifikace hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní spektrum IGF-1 analogu MC2 je znázorněno na **obrázku 14** (str. 42).

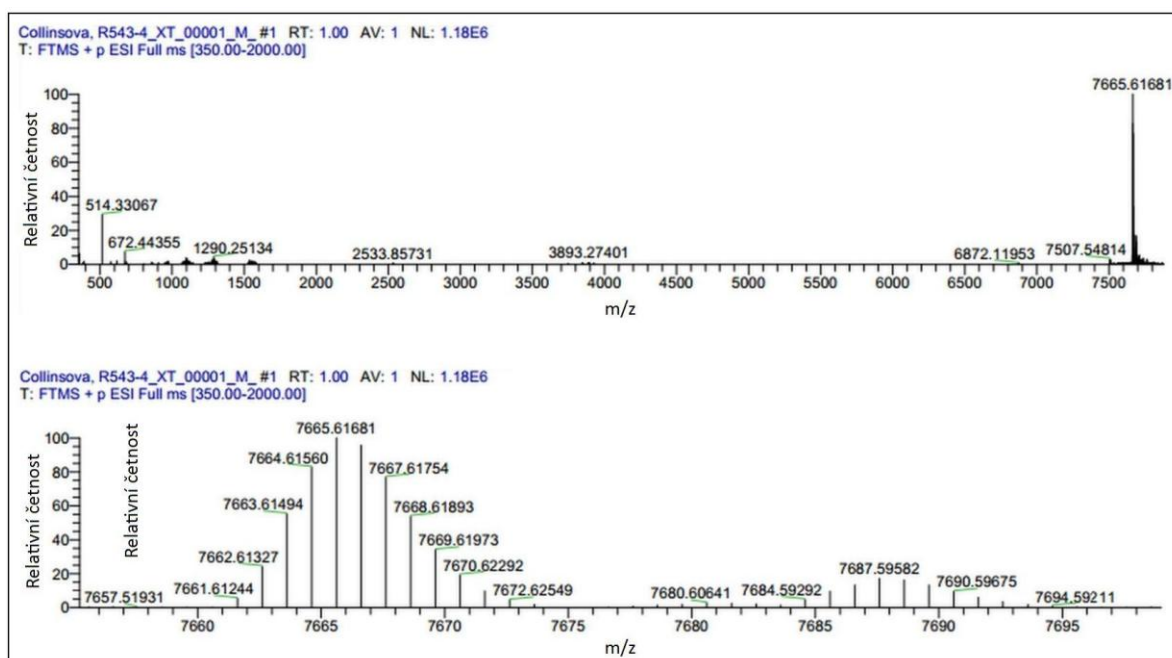
Celý postup přípravy MC2 byl proveden 2x s průměrným výtěžkem $0,56 \pm 0,2\%$ (50 mg směsi obou aminokyselinových řetězců poskytuje cca 0,2 mg analogu MC2).



Obrázek 12: Separace produktů rekombinace gelovou chromatografií za použití kolony Sephadex G50 (Pharmacia). Červeně je vyznačena oblast, pod kterou se vyskytoval IGF-1 analog MC2.



Obrázek 13: Separace IGF-1 analogu MC2 pomocí preparativního provedení RP-HPLC za použití kolony Vydac C4 (214TP510) (Fisher Scientific) .

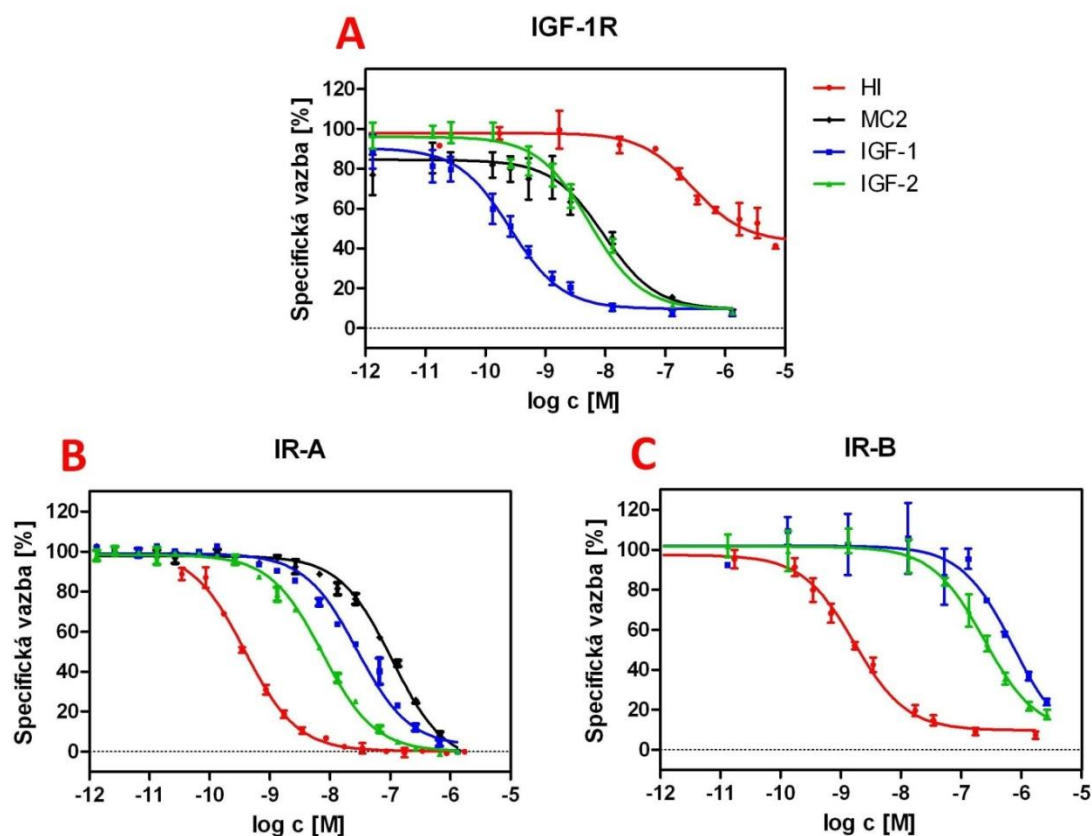


Obrázek 14: Hmotnostní spektrum IGF-1 analogu MC2. Monoizotopická hmotnost MC2 je 7661,6, relativní molekulová hmotnost je 7666,6.

5.2 Stanovení vazebné afinity IGF-1, IGF-2, MC2 a inzulinu vůči IGF-1R a IR

Disociační konstanty byly stanoveny podle popisu v **kapitole 4.2** (str. 31). Vazebná afinita vůči IGF-1R a IR-A byla testována pro IGF-1, IGF-2, MC2 a HI. Vazebná afinita vůči IR-B byla stanovena pro IGF-1, IGF-2 a HI.

Získané vazebné křivky jsou znázorněny na **obrázku 15**. Získané hodnoty disociačních konstant a afinit daných ligandů k receptorům vztažené k vysokoafinitnímu ligandu jsou uvedeny v **tabulce 5** (str. 44). IGF-1 analog vykazoval ve srovnání s IGF-1 3,6% afinitu vůči IGF-1R a 30% afinitu vůči IR-A.



Obrázek 15: Vazebné křivky lidského inzulinu, IGF-1, IGF-2 a dvouřetězcového IGF-1 analogu MC2 vůči IGF-1R (A), IR-A (B) a IR-B (C). Vazebná afinita analogu MC2 nebyla testována vůči IR-B.

Tabulka 5: Stanovené disociační konstanty a vazebné afinity lidského inzulinu, IGF-1, IGF-2 a IGF-1 analogu MC2 vůči IGF-1 receptoru a oboum izoformám inzulinového receptoru. SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation).

| | $K_d \pm SD$ [nM] | Vazebná afinita [%] | Počet měření |
|----------------|-------------------|---------------------|--------------|
| IGF-1R | | | |
| Inzulin | 292 ± 54 | 0,1 | 3 |
| IGF-1 | 0,24 ± 0,10 | 100 | 5 |
| IGF-2 | 5,11 ± 3,25 | 4,7 | 4 |
| MC2 | 6,74 ± 2,62 | 3,6 | 3 |
| IR-A | | | |
| Inzulin | 0,20 ± 0,02 | 100 | 5 |
| IGF-1 | 14,7 ± 2,1 | 1,4 | 3 |
| IGF-2 | 3,96 ± 0,28 | 5,2 | 2 |
| MC2 | 48,3 ± 2,9 | 0,4 | 3 |
| IR-B | | | |
| Inzulin | 1,42 ± 0,25 | 100 | 4 |
| IGF-1 | 695 ± 320 | 0,2 | 2 |
| IGF-2 | 208 ± 26 | 0,7 | 3 |

5.3 Studium aktivace receptorů a následných vnitrobuněčných signalizačních drah

5.3.1 Porovnání množství proteinů ve vzorcích

Porovnání aktivace signalizačních kaskád různými koncentracemi ligandů bylo možné pouze za předpokladu, že v každém vzorku (v každé jamce na kultivační destičce) bylo stejné množství buněk. Toho bylo docíleno pečlivým promícháváním suspenze buněk (linie R⁺³⁹, R⁻/IR-A či R⁻/IR-B (viz kapitola 4.3.1, str. 33)) při jejich kultivaci.

Počet buněk a koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byly průběžně kontrolovány v průběhu všech experimentů. Ve vybraných vzorcích bylo stanoveno celkové množství proteinů (viz kapitoly 4.3.3.1 a 4.3.3.2, str. 34-35).

Množství proteinů nanášených do komůrek gelů bylo ověřováno porovnáním množství proteinů na polyakrylamidových gelech obarvených roztokem Coomassie Brilliant Blue. Metodou přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu a následnou detekcí protilátek bylo u jednotlivých vzorků porovnáváno množství aktinu a receptorů

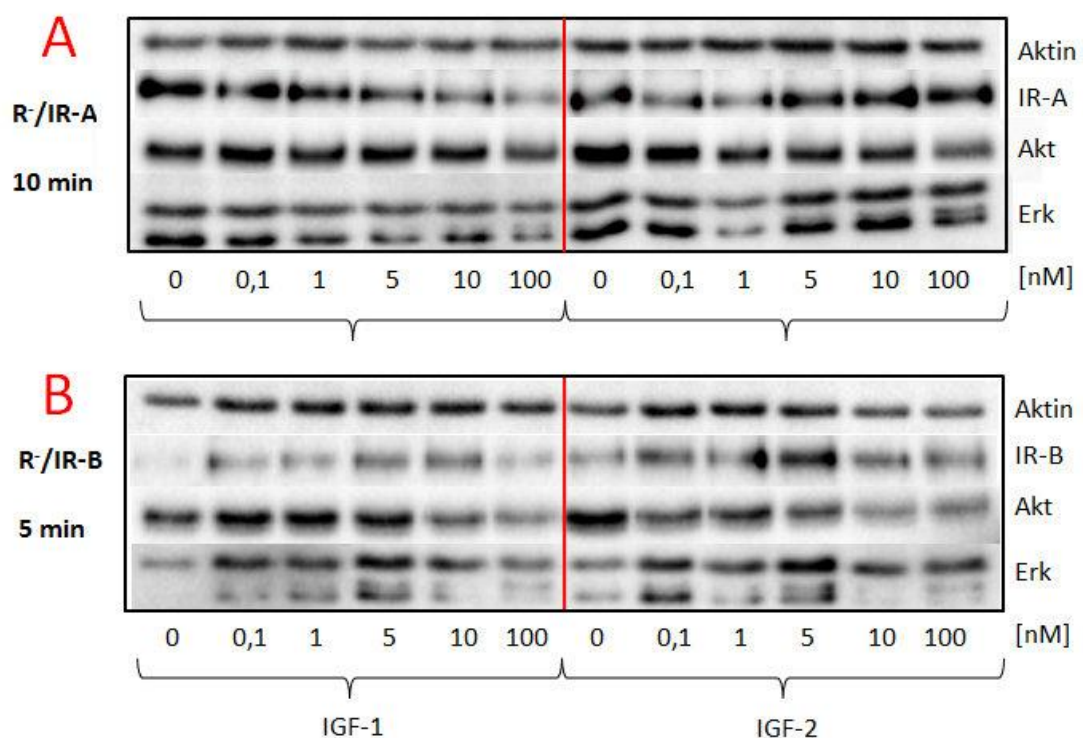
(IGF-1R/IR, dle typu použitých buněčných linií) na membránách buněk. U náhodných vzorků bylo dále také porovnáno celkové množství proteinů Akt a Erk. Ukázky membrán pro buněčné linie R⁻/IR-A a R⁻/IR-B jsou na **obrázku 16** (str. 46).

Mezi jednotlivými vzorky byla ve většině případů pozorována variabilita asi 20%. Tento údaj je typický pro biologické vzorky. Údaje získané pro buněčnou linii R⁺³⁹ jsou uvedeny v **tabulce 6**, údaje získané pro buněčné linie R⁻/IR-A a R⁻/IR-B byly srovnatelné.

Tabulka 6: Porovnání množství aktinu na PVDF membránách. Množství aktinu je uvedeno jako intenzita chemiluminiscenčního signálu. Každý z údajů pochází z vyhodnocení jedné PVDF membrány, vždy je uvedena variabilita mezi jednotlivými vzorky na dané membráně. Údaje pochází z experimentů prováděných na buněčné linii R⁺³⁹.

| Membrána/Gel | Aktin [pxl] | Variabilita [%] |
|--------------|-------------|-----------------|
| 1 | 14,5 ± 3,2 | 22 |
| 2 | 15,2 ± 3,2 | 21 |
| 3 | 13,6 ± 2,1 | 15 |
| 4 | 16,1 ± 4,2 | 26 |
| 5 | 19,5 ± 3,0 | 15 |

Normalizace intenzit v prouzcích na PVDF membránách byla prováděna vyhodnocovacím programem Image-LabTM Software vzhledem k celkové denzitě membrány. Pro určení relativních hodnot intenzity se obvykle využívá vztahení naměřené intenzity k invariantnímu proteinu (např. aktin) nebo k bazální hodnotě. Vzhledem k tomu, že pozorovaná variabilita mezi jednotlivými vzorky byla standardně kolem 20%, přepočítávání na množství aktinu by pouze formálně změnilo podobu hodnot. Jednotlivé linie (R⁺³⁹, R⁻/IR-A a R⁻/IR-B) se do určité míry lišily množstvím molekul konkrétního vloženého receptoru na membránách¹²⁰ a růstovými vlastnostmi, proto byly naměřené hodnoty intenzit vztaženy vždy k hodnotě maximální stimulace (10 nM koncentrace nejsilnějšího ligandu, tedy lidského inzulinu v případě linií R⁻/IR-A a R⁻/IR-B a IGF-1 v případě linie R⁺³⁹). Výsledné grafy jsou proto vyjádřením schopnosti daného ligandu stimulovat buňky v poměru k nejsilnějšímu ligandu bez ohledu na typ použité buněčné linie.



Obrázek 16: Porovnání aktinu, receptoru (IR-A/IR-B), proteinu Akt a proteinu Erk ve vzorcích na PVDF membránách po stimulaci pomocí IGF-1 a IGF-2 v různých koncentracích. A – vzorky testované na izoformě A inzulinového receptoru. Doba stimulace buněk pomocí ligandů byla ve všech případech 10 minut. B – vzorky testované na izoformě B inzulinového receptoru. Doba stimulace pomocí ligandů byla ve všech případech 5 minut. Stanovení jednotlivých proteinů na PVDF membránách nepochází ze stejných membrán, podmínky experimentů však byly v rámci A a B porovnatelné.

5.3.2 Výběr protilátek

Pro detekci fosforylace receptoru byly k dispozici dvě protilátky: protilátka detekující fosforylaci tyrosinu 1158 IR/1131 IGF-1R a protilátka detekující fosforylaci tyrosinů 1162 a 1163 IR/1135 a 1136 IGF-1R. Pro testování byla zvolena pouze protilátka detekující fosforylaci tyrosinu 1158 IR/1131 IGF-1R, protože u druhé zmíněné protilátky byl konečný detekovaný chemiluminiscenční signál příliš slabý a pro úspěšné použití této protilátky by byla nutná nanáška většího množství vzorku, která nebyla umožněna z důvodu objemu komůrek na polyakrylamidových gelech připravených za účelem SDS-elektroforézy.

Detekce fosforylace blíže nespecifikovaných tyrosylových zbytků byla provedena pouze na náhodně vybraných vzorcích, protože výsledky odpovídaly těm získaným pro fosforylaci tyrosinu 1158 na IR/1131 na IGF-1R.

5.3.3 Testování aktivace IGF-1R a s ním spojených signalizačních drah

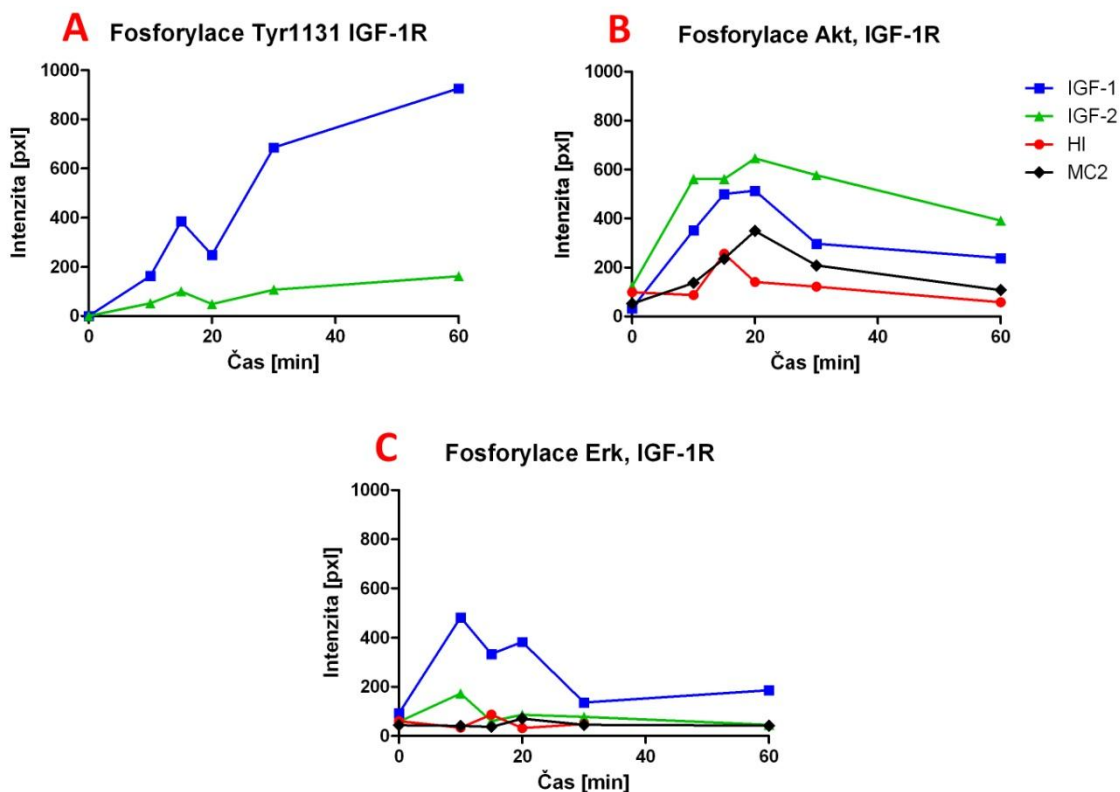
Buněčná linie R⁺³⁹ byla použita k testování působení IGF-1, IGF2, HI a MC2 na IGF-1 receptor a s jeho aktivací související vnitrobuněčné děje.

Na PVDF membránách po provedení přenosu proteinů z gelu byly zkoumány jak časové, tak koncentrační závislosti působení IGF-1, IGF-2, analogu MC2 a lidského inzulinu na fosforylaci tyrosinu 1131 IGF-1R a proteinů Akt a Erk.

5.3.3.1 Časové závislosti

Časové závislosti (5, 10, 15, 20, 30, 40 a 60 minut) byly zkoumány při koncentraci 5 nM. Experimenty byly pouze orientační a byly provedeny za účelem ověřit dobu působení ligandů, při které dochází k největší míře stimulace IGF-1 receptoru a vnitrobuněčných proteinů Akt a Erk.

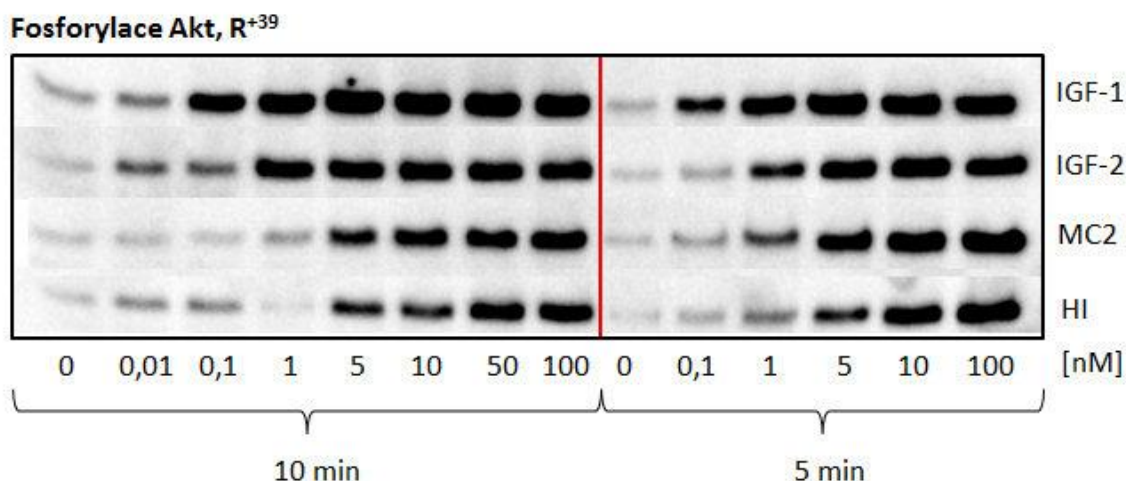
Míra stimulace IGF-1 receptoru se obecně zvyšuje s časem (viz *obr 17A*, str. 48). V případě fosforylace Akt bylo maximum signálu zaznamenáno při působení ligandů na receptor po dobu 10-20 minut, vysoká intenzita signálu je však pozorovatelná již od 5 minut (viz *obr. 17B*, str. 48). Maximum stimulace Erk bylo zaznamenáno při působení ligandů na receptor po dobu 5-10 minut, při delší době intenzita signálu klesá (viz *obr. 17C*, str. 48).



Obrázek 17: Časové závislosti působení IGF-1, IGF-2, lidského inzulinu (HI) a dvouřetězcového analogu IGF-1 (MC2) na fosforylaci IGF-1R (A) a vnitrobuněčných proteinů Akt (B) a Erk (C) při stimulaci IGF-1 receptoru. V případě testování fosforylace Tyr1131 IGF-1R nebyl zaznamenán žádný chemiluminiscenční signál po stimulaci buněk pomocí inzulinu a MC2. Použitá koncentrace ligandů byla 5nM.

5.3.3.2 Koncentrační závislosti

Koncentrační závislosti v časech 5, 15, 30 a 60 minut byly zkoumány pro koncentrace 0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM a 100 nM. Koncentrační závislosti v časech 10 a 20 minut byly zkoumány pro koncentrace 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM a 100 nM. Ukázka PVDF membrány, na které byla detekována fosforylace proteinu Akt při stimulaci různými ligandy v různých koncentracích je na **obrázku 18** (str. 49).



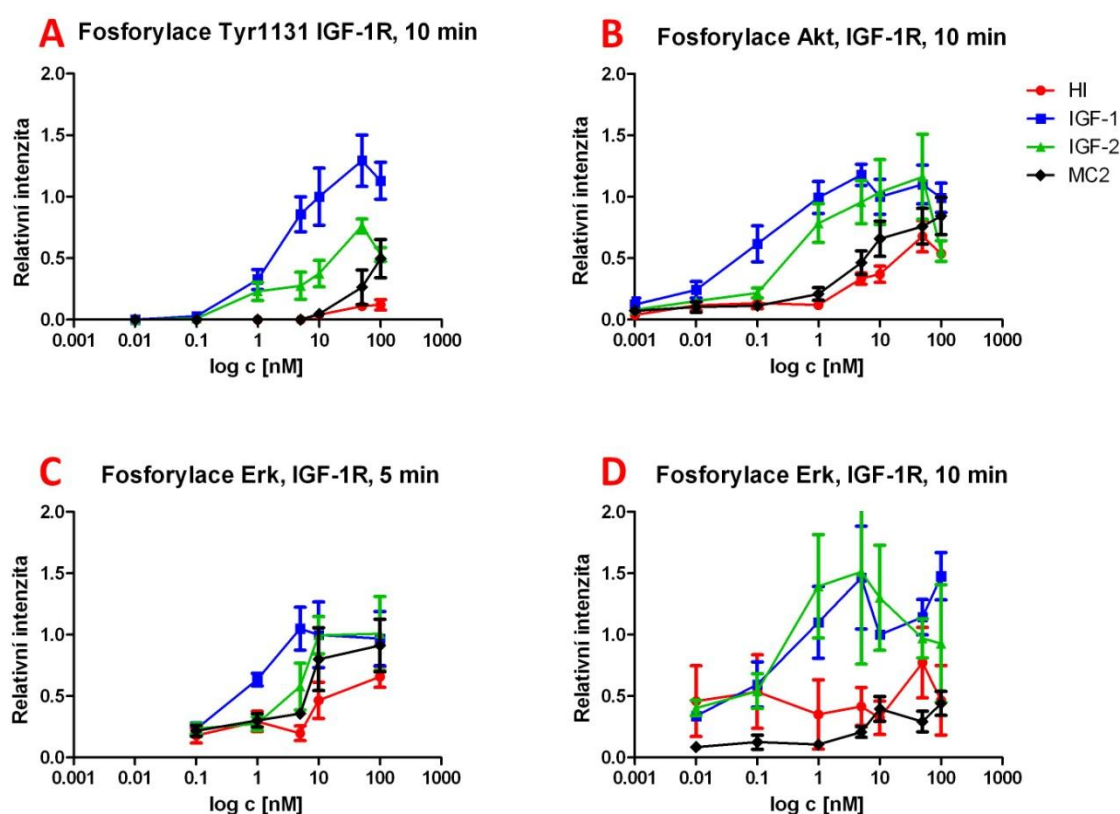
Obrázek 18: Detekce fosforylace proteinu Akt na PVDF membránách při stimulaci IGF-1 receptoru pomocí IGF-1, IGF-2, dvouřetězcového analogu IGF-1 (MC2) a lidského inzulinu (HI) v různých koncentracích. Doba stimulace pomocí jednotlivých ligandů byla 10 a 5 minut.

U stimulace IGF-1 receptoru, tedy fosforylace tyrosinu 1131, byl obecně pozorován nárůst signálu se zvyšující se koncentrací. Signál stimulace vyvolané působením IGF-1 je nejsilnější a při delším časovém působení patrný již při nízkých koncentracích (např. při stimulaci buněk po dobu 60 minut již při koncentraci 0,1 nM). Stimulace receptoru vyvolaná působením IGF-2 rovněž s koncentrací roste, signál je však i v 60 minutách patrný až při koncentraci 5 nM a obecně nižší, než signál vyvolaný působením IGF-1. Stimulace vyvolaná působením analogu MC2 je při delším časovém působení (60 min) patrná při koncentraci 5 nM, při kratším časovém působení (10-20 min) až při koncentracích vyšších (10 nM). Signál vyvolaný vyšší koncentrací analogu MC2 při delším časovém působení je srovnatelný se signálem IGF-2, v ostatních případech je nižší. Signál vyvolaný působením lidského inzulinu je ze všech testovaných ligandů nejnižší. Stimulace fosforylace Tyr1131 při působení ligandů po dobu 10 minut je znázorněna na **obrázku 19A** (str. 50), přičemž za těchto podmínek dosahuje intenzita vyvolaná působením IGF-2 cca 60%, analog MC2 20% a lidský inzulin 10% intenzity vyvolané působením IGF-1.

Fosforylace proteinu Akt obecně narůstá se zvyšující se koncentrací. Signál vyvolaný působením IGF-1 je nejsilnější, pozorovatelný již při koncentraci 0,1 nM, signál ostatních ligandů je výrazněji pozorovatelný až od koncentrace o řád vyšší. Stimulace vyvolaná působením IGF-2 je nižší než stimulace IGF-1 (cca 80% intenzity

IGF-1), nejslabší je signál lidského inzulinu (cca 25% intenzity IGF-1). Signál vyvolaný působením analogu MC2 je silnější než signál inzulinu, ale slabší než signály jak IGF-1 (cca 35%) , tak IGF-2 (viz **obrázky 18**, str. 49 a **19B**).

U fosforylace proteinu Erk byl pozorován nárůst signálu s koncentrací pouze při působení ligandů po dobu 5 minut. Signály vyvolané působením IGF-1 a IGF-2 jsou porovnatelné, nejslaběji na stimulaci Erk působí HI (cca 30% intenzity IGF-1). Signál vyvolaný působením analogu MC2 je opět silnější než signál inzulinu, ale slabší než signály IGF-1 (cca 35%) a IGF-2 (viz **obr. 19C**). Při působení ligandů delším než 5 minut nebyla pozorována žádná koncentrační závislost (viz **obr. 19D**).



Obrázek 19: Koncentrační závislosti působení IGF-1, IGF-2, lidského inzulinu (HI) a dvouřetězcového analogu IGF-1 (MC2) na fosforylaci Tyr1131 IGF-1R (A) a vnitrobuněčných proteinů Akt (B) a Erk (C,D) při stimulaci IGF-1 receptoru. Doba trvání stimulace buněk ligandy byla 10 minut (A,B,D) a 5 minut (C).

5.3.4 Testování aktivace obou izoform IR a s nimi spojených signalizačních drah

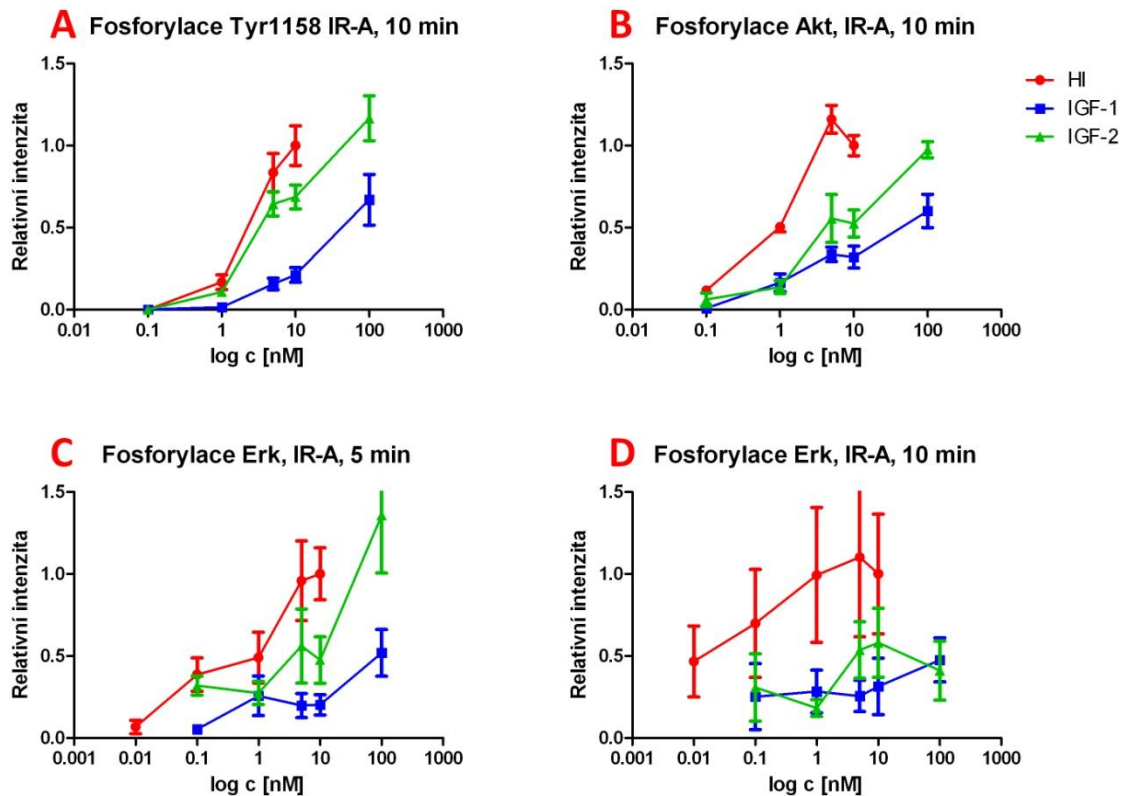
K testování působení IGF-1, IGF-2 a HI na izoformy A a B inzulinového receptoru a s nimi spojené vnitrobuněčné děje byly použity buněčné linie R⁻/IR-A (v případě IR-A) a R⁻/IR-B (v případě IR-B). Na PVDF membránách po provedení přenosu byly v případě těchto receptorů zkoumány pouze koncentrační závislosti (0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM a 100 nM), a to v časech 5 a 10 minut.

5.3.4.1 Testování aktivace IR-A a s ním spojených signalizačních drah

Stimulace izoformy A inzulinového receptoru, tedy fosforylace tyrosinu 1158 tohoto receptoru, obecně narůstá s koncentrací. Nejvyšší míra stimulace IR-A byla pozorována při působení lidského inzulinu. IGF-2 stimuluje fosforylaci Tyr1158 IR-A méně než inzulin (cca 80% intenzity HI), avšak znatelně více než IGF-1 (cca 25% intenzity HI) (viz **obr. 20A**, str. 52). Výsledky detekce fosforylace blíže nespecifikovaných tyrosylových zbytků korespondují s výsledky fosforylace tyrosinu 1158.

Míra fosforylace proteinu Akt obecně stoupá se zvyšující se koncentrací. Fosforylace Akt je na buněčné lince R⁻/IR-A nejvíce stimulována pomocí inzulinu. Míra fosforylace vyvolaná působením IGF-2 (cca 45% intenzity HI) je vyšší než míra fosforylace vyvolaná působením IGF-1 (cca 25% intenzity HI) (viz **obr. 20B**, str. 52).

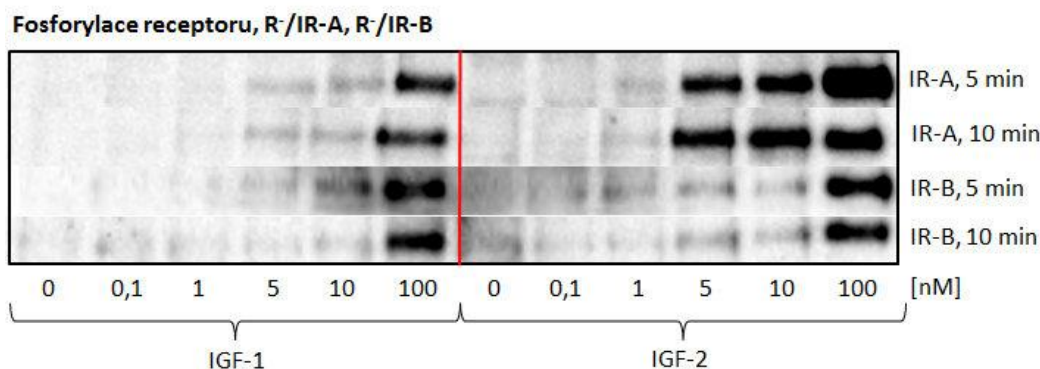
V případě fosforylace proteinu Erk byl nárůst signálu s koncentrací pozorován při působení ligandů na receptor po dobu 5 minut. Nejvyšší míra stimulace proteinu Erk byla pozorována při působení inzulinu, nejmenší při působení IGF-1 (cca 25% intenzity HI). IGF-2 stimuluje fosforylaci proteinu Erk méně než inzulin (cca 65% intenzity HI), avšak více než IGF-1 (viz **obr. 20C**, str. 52). V případě působení ligandů na receptor po dobu 10 minut a více nebyl pozorován žádný reprodukovatelný obecný trend (viz **obr. 20D**, str. 52).



Obrázek 20: Koncentrační závislosti působení IGF-1, IGF-2 a lidského inzulinu (HI) na fosforylaci Tyr1158 IR-A (A) a vnitrobuněčných proteinů Akt (B) a Erk (C,D) při stimulaci izoformy A inzulinového receptoru. Doba trvání stimulace buněk ligandy byla 10 minut (A, B, D) a 5 minut (C).

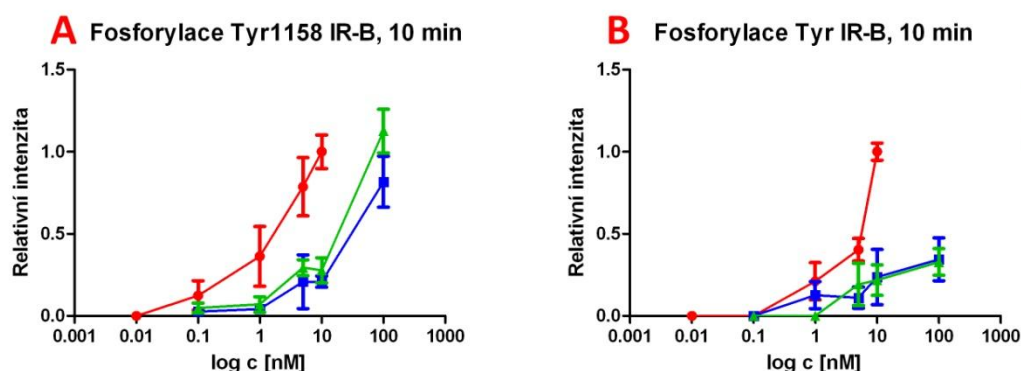
5.3.4.2 Testování aktivace IR-B a s ním spojených signalizačních drah

Míra fosforylace Tyr1158 v případě izoformy B inzulinového receptoru opět v případě všech ligandů narůstá s koncentrací. Stejně jako u buněčné linie R⁻/IR-A, i zde byl největší signál zaznamenán v případě stimulace pomocí inzulinu. Při použití buněčné linie R⁻/IR-B však nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi stimulací způsobenou pomocí IGF-2 a IGF-1 (35% intenzity HI v případě IGF-2 a cca 25% intenzity HI v případě IGF-1) (viz **obrázky 21 a 22A**, str. 53).



Obrázek 21: Detekce fosforylace Tyr1158 izoformy A (IR-A) a B (IR-B) inzulinového receptoru při stimulaci zmíněných receptorů pomocí IGF-1 a IGF-2 v různých koncentracích. Doba stimulace pomocí obou ligandů byla 5 a 10 minut.

Výsledky získané detekcí fosforylace blíže nespecifikovaných tyrosylových zbytků receptoru odpovídají výsledkům získaným detekcí fosforylace tyrosinu 1158 (viz *obr. 22B*)

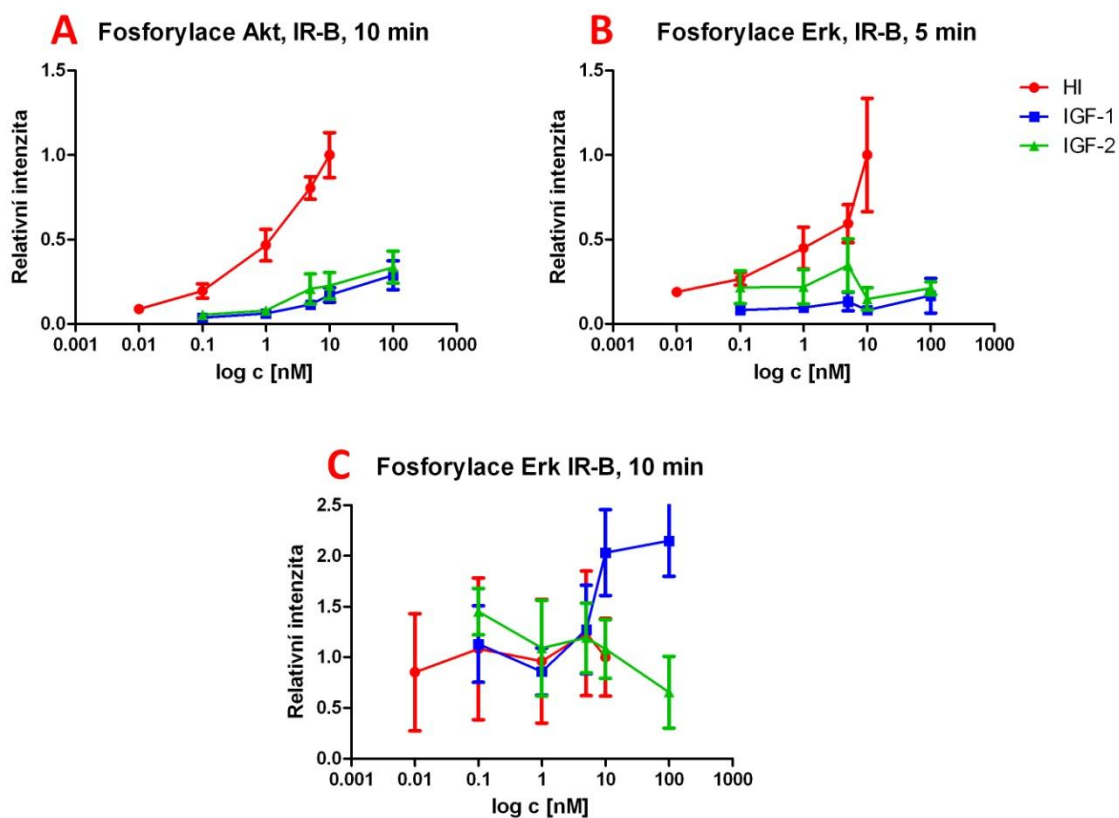


Obrázek 22: Koncentrační závislosti působení IGF-1, IGF-2 a lidského inzulinu (HI) na fosforylaci Tyr1158 IR-B (A) a blíže nespecifikovaných tyrosylových zbytků na IR-B (B). Doba trvání stimulace buněk ligandy byla 10 minut.

V případě proteinu Akt opět míra fosforylace obecně narůstá s koncentrací. Lidský inzulin stimuluje fosforylaci Akt z testovaných ligandů nejsilněji, signály vyvolané působením IGF-1 a IGF-2 jsou porovnatelné, a to cca 30% intenzity HI v případě IGF-2 a cca 20% intenzity HI v případě IGF-1 (viz *obr. 23A*, str. 54).

U fosforylace proteinu Erk byla opět koncentrační závislost pozorována pouze při stimulaci buněk pomocí ligandů po dobu 5 minut, nikoliv při delším časovém působení (viz *obr. 23B, C*, str. 54). Výrazná koncentrační závislost byla navíc pozorována pouze v případě stimulace pomocí inzulinu, v případě IGF-1 a IGF-2 nárůst

signálu s rostoucí koncentrací pozorován nebyl. Zdá se však, že IGF-2 stimuluje fosforylaci Erk mírně silněji než je tomu při stimulaci receptoru pomocí IGF-1 (viz *obr. 23B*).



Obrázek 23: Koncentrační závislosti působení IGF-1, IGF-2 a lidského inzulinu (HI) na fosforylaci vnitrobuněčných proteinů Akt (A) a Erk (B,C) při stimulaci izoformy B inzulinového receptoru. Doba trvání stimulace buněk ligandy byla 10 minut (A,C) a 5 minut (B).

6 DISKUSE

Příprava analogů inzulínu a inzulínu podobných růstových faktorů a objasnění jejich úlohy v rámci buněčné signalizace může výrazně napomoci pochopení funkce zmíněných peptidů a v návaznosti na to umožnit syntézu peptidů s vylepšenými vlastnostmi, vhodných pro terapeutické využití. V rámci této práce byl připraven analog inzulínu podobného růstového faktoru-1 (MC2), který se od IGF-1 sekvenčně neliší, chybí však peptidová vazba mezi dvěma argininy na pozicích 36 a 37 – jedná se tedy o dvouřetězcový analog IGF-1. MC2 byl následně použit k porovnání jeho schopnosti stimulovat IGF-1 receptor a s ním spojené vnitrobuněčné dráhy s lidským inzulínem a oběma inzulínu podobnými růstovými faktory.

Peptidy, stejně jako větší proteiny, je možné připravovat ve vhodně zvolených expresních systémech (např. *E. coli* nebo *S. cerevisiae*). Tato metoda využívá zavedení segmentu DNA kódujícího cílový protein či peptid do hostitelského organismu a přirozené schopnosti tohoto organismu na základě templátové DNA syntetizovat látku proteinové povahy. Výhodou metody je možnost podrobit syntetizovaný protein/peptid posttranslačním modifikacím (liší se v závislosti na zvoleném expresním systému), stejně jako sbalení proteinu do aktivní konformace. Při přípravě pozměněných látek je však metoda využívající expresi v živých systémech limitována využitím přirozených aminokyselin.

Jinou možností přípravy peptidů je *in vitro* syntéza na pevné fázi. Tato metoda umožňuje zavést do struktury peptidu kromě proteinogenních aminokyselin také složky přirozeně se v látkách proteinové povahy nevyskytující, tedy složky, pro které neexistuje kód v podobě genetické informace. Další výhodou syntézy *in vitro* oproti expresi peptidů (proteinů) v živých systémech je odpadající nutnost složité purifikace. Omezením je velikost peptidů, které je možno pomocí této metody připravit (metoda je vhodná pro syntézu peptidů obsahujících maximálně cca 40 aminokyselin). Syntézy na pevné fázi bylo využito za účelem této práce při přípravě IGF-1 analogu MC2.

MC2 je dvouřetězcový analog jednořetězcového IGF-1, neexistuje proto jeho přirozený prekurzor, jehož by bylo možno při přípravě v expresním systému využít, jako je to možné například při přípravě inzulínu, kdy je do buněk vložen DNA segment kódující proinzulin, ze kterého je následně inzulín přirozeně vyštěpen. Syntéza takového analogu v expresním systému by práci výrazně neusnadnila, protože by bylo nutné nasyntetizovat každý z obou aminokyselinových řetězců zvlášť a dále s nimi

pracovat stejně, jako tomu bylo v případě řetězců připravených *in vitro*. IGF-1 navíc není posttranslačně modifikován, proto nebylo třeba modifikace zajistit ani u jeho analogu MC2 a syntéza na pevné fázi byla z těchto důvodů vyhovující.

Oba aminokyselinové řetězce, ze kterých se peptid skládal, tzn. řetězec o aminokyselinách 1-36 sekvence IGF-1 (M) a řetězec o aminokyselinách 37-70 sekvence IGF-1 (N), byly zvlášť syntetizovány na pevné fázi metodou podle Merrifielda¹¹⁷. Ke spojení řetězců pomocí disulfidických vazeb a následné formace produktu do aktivní konformace bylo využito postupu dle Chance a spol.¹²¹. V rámci metody jsou thiolové skupiny cysteinů nejprve převedeny na skupiny S-sulfonátové, čímž je zabráněno tvorbě nežádoucích disulfidických vazeb v rámci jednotlivých řetězců. Po přidání obou řetězců do jednoho roztoku jsou S-sulfonátové skupiny stechiometricky redukovány dithiothreitem a následně oxidovány vzdušným kyslíkem za vzniku disulfidických vazeb. Metoda využívá přirozené schopnosti látek tvořit biologicky aktivní konformaci. I přes vznik vedlejších produktů se špatně formovanými disulfidickými vazbami je dosahováno uspokojivých výtěžků a metoda byla v minulosti (kromě samotného inzulinu) úspěšně použita k syntéze řady inzulinových analogů^{108, 109}. Rovněž v rámci této práce byl IGF-1 analog MC2 využitím zmíněné metody úspěšně připraven (průměrný výtěžek $0,56 \pm 0,2\%$). Tento relativně nízký výtěžek naznačuje, že tvorba správné konformace disulfidických vazeb s největší pravděpodobností probíhá mnohem úspěšněji na úrovni jednoho dlouhého řetězce, než na úrovni řetězců dvou, jako v našem případě.

Rekombinace aminokyselinových řetězců M a N poskytla kromě cílového analogu MC2 také jak produkty o vyšší molekulové hmotnosti (pravděpodobně produkty vzniklé spojením více řetězců), tak o molekulové hmotnosti nižší (pravděpodobně vznik disulfidických vazeb mezi cysteiny jednoho řetězce) než je molekulová hmotnost MC2 (viz **obr. 12**, str. 41). Dá se předpokládat rovněž vznik peptidů složených ze dvou stejných řetězců. Tyto vedlejší produkty byly odstraněny metodou gelové chromatografie a použity k recyklaci obou aminokyselinových řetězců a opětovné syntéze analogu MC2.

Produkty rekombinace o molekulové hmotnosti přibližně odpovídající MC2 byly děleny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Na chromatogramu byl podle očekávání kromě MC2 detekován také produkt, ve kterém byl Met23 řetězce N (odpovídá Met59 IGF-1, viz **obr 2**, str. 9) v oxidované formě, a dále produkt se špatně zformovanými disulfidickými vazbami (vazby Cys6M–Cys11N

a Cys12N–Cys16N namísto Cys6M–Cys12N a Cys11N–Cys16N v nativním MC2). Produkt s analogicky formovanými disulfidickými vazbami (Cys6–Cys47 a Cys48–Cys52 namísto Cys6–Cys48 a Cys47–Cys52 v nativním IGF-1) standardně vzniká i při přípravě IGF-1, a to nejen při syntéze *in vitro*, nýbrž i při expresi peptidu v expresním systému *E.coli*¹²². Přítomnost těchto peptidů potvrzují výsledky hmotnostní spektrometrie, kde byl produkt s oxidovaným Met23N detekován s molekulovou hmotností o 16 vyšší (odpovídá přítomnosti atomu kyslíku) než cílový produkt MC2, a produkt se špatně zformovanými disulfidickými vazbami s molekulovou hmotností stejnou jako cílový produkt MC2 (data nejsou zobrazena).

Stimulace receptorů (IGF-1R, IR-A či IR-B) a s nimi spojených signalizačních drah byla testována metodou přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu, kdy na membránách po provedení přenosu byly detekovány příslušné proteiny (receptor, protein Akt, protein Erk) ve své fosforylované (tedy aktivované) formě. V případě proteinu Erk byly na membránách detekovány dva proužky odpovídající proteinům Erk1 a Erk2 (molekulové hmotnosti 44 a 42 kDa). Data získaná detekcí obou proteinů se ve většině případů shodovala, protein o molekulové hmotnosti 44 kDa (tedy Erk1) však byl u některých vzorků (či na celých membránách) špatně detekovatelný, proto byly konečné grafy vytvořeny pouze z dat získaných detekcí fosforylace Erk2 o molekulové hmotnosti 42 kDa.

U IGF-1 analogu MC2 byla testována jeho afinita k IGF-1 receptoru a izoformě A inzulinového receptoru a zároveň jeho schopnost stimulovat IGF-1R a s ním spojené signalizační dráhy. U IGF-1, IGF-2 a lidského inzulinu byla testována jejich afinita k IGF-1R a oboum izoformám IR a zároveň jejich schopnost stimulovat tyto receptory a s nimi spojené signalizační dráhy.

Data získaná působením přirozených ligandů (tedy IGF-1, IGF-2 a inzulinu) na jednotlivé receptory byla konfrontována s literaturou. Bylo ověřeno, že inzulin a IGF-1 se s vysokou afinitou váží na své mateřské receptory (tedy obě izoformy inzulinového receptoru v případě inzulinu¹⁰⁰ a IGF-1 receptoru v případě IGF-1¹⁰¹) a ve vysoké míře vyvolávají jejich stimulaci.

Zároveň bylo pozorováno, že IGF-2 stimuluje autofosforylaci izoformy A inzulinového receptoru a s ním spojené signalizační dráhy v mnohonásobně vyšší míře než IGF-1, zatímco u izoformy B inzulinového receptoru podobný trend pozorován nebyl - míra stimulace vyvolaná oběma inzulinu podobnými růstovými faktory byla v případě IR-B porovnatelná (viz **obrázky 20-22**, str. 52-54). Obdobných výsledků bylo

dosaženo pomocí vazebných testů (viz **obr 15**, str. 43 a **tabulka 5**, str. 44). Bylo však pozorováno, že i při slabší vazbě ligandu k receptoru dochází k poměrně silnější aktivaci receptoru a spuštění vnitrobuněčných signálních drah. Například při (ve srovnání s inzulinem) 5,2% vazebné afinitě IGF-2 k IR-A dochází k cca 80% fosforylaci receptoru, 45% fosforylaci proteinu Akt a 65% fosforylaci proteinu Erk. Při 1,4% vazebné afinitě IGF-1 k IR-A dochází k cca 25% fosforylaci receptoru a proteinů Akt a Erk. Analogické výsledky byly pozorovány při testování izoformy B inzulinového receptoru i IGF-1 receptoru. Na základě těchto výsledků se zdá, že ke spuštění vnitrobuněčných signálních drah mohou výrazně přispívat i ligandy s mnohonásobně nižší afinitou pro receptor, než je afinita ligandu mateřského.

Výsledky získané v rámci této diplomové práce se řádově shodují s dostupnou literaturou. Námi získaná disociační konstanta popisující vazebnou afinitu IGF-2 vůči IR-A činí 3,96 nM, pro IGF-1 potom 14,7 nM. V případě IR-B jsou získané hodnoty 208 nM pro IGF-2 a 695 nM pro IGF-1. Rovněž byla ve srovnání s inzulinem detekována cca 80% autofosforylace IR-A při stimulaci receptoru pomocí IGF-2 a cca 25% hodnota při stimulaci pomocí IGF-1. V případě IR-B činí získané hodnoty cca 35% v případě IGF-2 a cca 25% v případě IGF-1, opět ve srovnání s inzulinem.

Podle výzkumu Tennagelse a Wenera¹²³ je IC_{50} IGF-2 k IR-A 6,2 nM, zatímco IC_{50} pro IGF-1 je 64,5 nM. V případě IR-B byla získána hodnota 46,6 nM pro IGF-2 a 171 nM pro IGF-1. Podle Gauguina a spol.¹²⁴ se disociační konstanta popisující vazbu IGF-2 k IR-A rovná 6,1 nM, zatímco hodnota získaná pro IGF-1 je 49,7 nM. Frasca a spol.⁴⁶ při testování míry autofosforylace IR-A při působení IGF-2 pozorovali EC_{50} v hodnotě 3,0 nM, zatímco při působení IGF-1 byla hodnota vyšší než 30 nM. Při experimentech prováděných na IR-B byla pro IGF-2 získána hodnota 24 nM, v případě IGF-1 byla hodnota opět vyšší než 30 nM.

Jako strukturní komponenty podílející se na vysoké afinitě IGF-2 (nikoliv však IGF-1) k izoformě A inzulinového receptoru byly podle Denleyho a spol.¹⁰¹ identifikovány C a D domény peptidu (domény IGF-1 a IGF-2 jsou znázorněny na **obrázku 2**, str. 9). Podle výzkumu chiméry IGF-1 obsahující ve své struktuře C či D doménu IGF-2 mají v obou případech vyšší afinitu k IR-A než IGF-1. Chiméra IGF-1 obsahující obě zmíněné domény odvozené z IGF-2 má potom afinitu k IR-A srovnatelnou s IGF-2. Na druhou stranu IGF-2 chiméry obsahující C, D či obě domény odvozené z IGF-1 mají, co se afinity k IR-A týče, vlastnosti podobné IGF-1.

Přítomnost exonu 11, tedy dvanácti aminokyselin na C-konci α -podjednotky inzulinového receptoru, nemá výrazný vliv na vazbu inzulinu¹⁰⁰, ovlivňuje však vazbu inzulinu podobného růstového faktoru-2 k inzulinovému receptoru⁴⁶. Bylo prokázáno, že pro vazbu inzulinu k IR je esenciálních posledních 16 aminokyselin na C-konci α -podjednotek receptoru¹²⁵. Přítomnost aminokyselin kódovaných exonem 11 na C-konci α -podjednotek izoformy B inzulinového receptoru může stericky bránit vazbě IGF-2 obsahujícího C a D domény, tedy komponenty, které se nevyskytují v molekule inzulinu¹⁰¹.

Vzhledem k tomu, že vysoký výskyt IR-A byl pozorován v embryonálních a rakovinných tkáních⁴⁶, dá se předpokládat určitá funkce IR-A spojená se zárodečným vývojem a růstovými pochody probíhajícími v rakovinných buňkách. Zdá se, že hlavním zprostředkovatelem těchto pochodů je právě inzulinu podobný růstový faktor-2. Tato hypotéza již byla v minulosti podpořena řadou výzkumů, které prokazují, že IGF-2 zprostředkovává růst buněk přes inzulinový receptor¹²⁶, či že se působení IGF-2 na IR u myši skutečně významně podílí na růstu embryí¹²⁷.

U dvouřetězcového IGF-1 analogu MC2 byla testována jeho schopnost stimulovat pouze IGF-1 receptor a s ním spojené signalizační dráhy. Schopnost stimulovat inzulinový receptor testována nebyla z důvodu nízké afinity IGF-1 k oboum izoformám IR¹⁰¹ a zároveň potvrzení nízké afinity MC2 k izoformě A inzulinového receptoru (viz **obr. 15**, str. 43 a **tabulka 5**, str. 44)

Výzkumy naznačují, že pro správnou funkci IGF-1 je nutná přítomnost argininů 36 a 37 v jeho molekule. Podle Saegusa a spol.¹¹⁴ a Fujity a spol.¹⁰⁵ je pro správný přenos signálu při interakci IGF-1 s IGF-1 receptorem nutná ještě interakce Arg36 a Arg37 s integrinem $\alpha\beta3$. Fujita a spol.¹⁰⁵ dále tvrdí, že analog IGF-1, ve kterém byly oba zmíněné argininy zaměněny za kyselinu glutamovou, se sice vázal k IGF-1 receptoru, měl však antagonistické vlastnosti, tedy neaktivoval receptor a nestimuloval vnitrobuněčné signalizační dráhy (konkrétně nedocházelo k fosforylaci receptoru, proteinu Akt ani proteinu Erk).

IGF-1 s rozpojenou vazbou mezi Arg36 a Arg37 (tedy molekula shodná s analogem MC2) byla v minulosti detekována v krevní plazmě¹¹⁶. Rovněž výsledky krystalografických studií naznačují možnost přítomnosti této látky *in vivo*¹¹⁵. Dvouřetězcový analog IGF-1 ve své struktuře sice Arg36 a Arg37 obsahuje, chybí však peptidová vazba mezi oběma aminokyselinami, proto se dá předpokládat větší či menší změna v terciární struktuře molekuly. Za účelem ověřit, zda bude MC2 vykazovat

podobné vlastnosti jako R36E/R37E IGF-1, byla v rámci této práce testována jeho vazebná afinita vůči IGF-1 receptoru a schopnost aktivovat tento receptor a fosforylaci proteinů Akt a Erk.

Byla pozorována cca 20% aktivace IGF-1R pomocí analogu MC2 ve srovnání s IGF-1. Stimulace fosforylace proteinů Akt a Erk vlivem MC2 byla cca 35% ve srovnání s IGF-1. Ve všech případech byla fosforylace proteinů při stimulaci IGF-1R pomocí MC2 o něco větší než při stimulaci receptoru pomocí inzulínu, avšak výrazně menší než při stimulaci pomocí IGF-1 a menší než při stimulaci pomocí IGF-2. Bylo tedy zjištěno, že při rozpojení vazby mezi Arg36 a Arg37 v molekule IGF-1 dochází k výrazné ztrátě aktivity molekuly.

Zjištěná vazebná afinita MC2 k IGF-1 receptoru je 3,6% ve srovnání s IGF-1, což je hodnota srovnatelná s hodnotou získanou pro IGF-2 (4,7%). Oproti IGF-2 byla však při stimulaci IGF-1R pomocí analogu MC2 zaznamenaná snížená schopnost aktivovat receptor (ve srovnání s IGF-1 cca 60% při stimulaci pomocí IGF-2, cca 20% při stimulaci pomocí MC2) a s ním spojené vnitrobuněčné dráhy (fosforylace proteinu Akt dosahovala ve srovnání s IGF-1 při stimulaci pomocí IGF-2 cca 80% a při stimulaci pomocí MC2 cca 35%, podobných výsledků bylo dosaženo rovněž při detekci fosforylace proteinu Erk). Nebyly tedy pozorovány vyloženě antagonistické vlastnosti MC2 vůči IGF-1 receptoru, jako tomu bylo u R36/R37E IGF-1, byla však zaznamenána relativně nižší schopnost tohoto analogu aktivovat receptor a s ním spojené signální dráhy ve srovnání s vazebnou afinitou k receptoru.

S ohledem na výsledky této diplomové práce se dá předpokládat, že dvouřetězcový analog IGF-1 s chybějící peptidovou vazbou mezi Arg36 a Arg37 by mohl být degradačním produktem IGF-1, který pravděpodobně nemá žádnou významnou fyziologickou funkci.

7 ZÁVĚR

- 1) V rámci této diplomové práce byl metodou syntézy na pevné fázi připraven dvouřetězcový analog inzulinu podobného růstového faktoru-1 (MC2). Analog se sekvenčně neliší od struktury IGF-1, postrádá však peptidovou vazbu mezi Arg36 a Arg37 přítomnou ve struktuře IGF-1.
- 2) Bylo zjištěno, že oproti IGF-1 analog MC2 ztrácí vazebnou afinitu k IGF-1 receptoru (3,6% ve srovnání s IGF-1) a izoformě A inzulinového receptoru (30% ve srovnání s IGF-1). Byla potvrzena rovněž snížená stimulace IGF-1 receptoru a s ním spojených vnitrobuněčných signalizačních drah při působení IGF-1 analogu MC2 ve srovnání s IGF-1. Vzhledem k faktu, že látka shodná s MC2 byla v minulosti detekována v krevní plazmě¹¹⁶, je pravděpodobné, že se jedná o degradační produkt IGF-1 bez vlastní fyziologické funkce.
- 3) Byla testována vazebná afinita lidského inzulinu a inzulinu podobných růstových faktorů-1 a 2 vůči IGF-1 receptoru a oběma izoformám inzulinového receptoru (IR-A a IR-B). Dále byla zkoumána aktivace jednotlivých receptorů a s nimi spojených signalizačních drah při působení zmíněných ligandů. Byla pozorována zvýšená afinita IGF-2 vůči izoformě A inzulinového receptoru oproti izoformě B a rovněž zvýšená aktivace IR-A a s ním spojených vnitrobuněčných signalizačních drah při působení IGF-2 oproti IR-B. U IGF-1 i přes poměrně výrazný rozdíl v afinitě k oběma izoformám inzulinového receptoru tak výrazný rozdíl ve stimulaci dějů spojených s těmito receptory jako u IGF-2 pozorován nebyl.

SEZNAM LITERATURY

1. I. Bentov, H. Werner: *Pediatr Endocrinol Rev* **1**, 352-360 (2004).
2. C. M. Taniguchi, B. Emanuelli, C. R. Kahn: *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85-96 (2006).
3. M. Annunziata, R. Granata, E. Ghigo: *Acta Diabetol* **48**, 1-9 (2011).
4. H. M. Khandwala, I. E. McCutcheon, A. Flyvbjerg, K. E. Friend: *Endocr Rev* **21**, 215-244 (2000).
5. M. N. Pollak, E. S. Schernhammer, S. E. Hankinson: *Nat Rev Cancer* **4**, 505-518 (2004).
6. A. Denley, L. J. Cosgrove, G. W. Booker, J. C. Wallace, B. E. Forbes: *Cytokine Growth F R* **16**, 421-439 (2005).
7. G. Baumann: *Am J Pharmacogenomic* **2**, 93-111 (2002).
8. Z. Laron: *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 1031-1044 (2004).
9. L. J. Murphy, G. I. Bell, H. G. Friesen: *Endocrinology* **120**, 1279-1282 (1987).
10. F. G. Banting, C. H. Best: *J Lab Clin Med* **7**, 251-266 (1922).
11. F. G. Banting, C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, A. A. Fletcher: *Can Med Assoc J* **12**, 141-146 (1922).
12. L. Rosenfeld: *Clin Chem* **48**, 2270-2288 (2002).
13. J. J. Abel: *P Natl Acad Sci USA* **12**, 132-136 (1926).
14. F. Sanger, H. Tuppy: *Biochem J* **49**, 463-481 (1951).
15. F. Sanger, H. Tuppy: *Biochem J* **49**, 481-490 (1951).
16. F. Sanger, E. O. P. Thompson: *Biochem J* **53**, 353-366 (1953).
17. F. Sanger, E. O. P. Thompson: *Biochem J* **53**, 366-374 (1953).
18. W. D. Salmon, W. H. Daughaday: *J Lab Clin Med* **49**, 825-836 (1957).
19. W. H. Daughaday, W. D. Salmon, J. L. Van den Brande, J. J. Van Wyk, M. S. Raben, K. Hall: *Nature* **235**, od str. 107 (1972).
20. E. R. Froesch, H. Buergi, E. B. Ramseier, P. Bally, A. Labhart: *J Clin Invest* **42**, 1816-1834 (1963).

21. D. G. Klapper, M. E. Svoboda, J. J. Van Wyk: *Endocrinology* **112**, 2215-2217 (1983).
22. W. H. Daughaday, K. Hall, W. D. Salmon, J. L. Van den Brande, J. J. Van Wyk: *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 1075-1076 (1987).
23. D. S. H. W. Nicol, L. F. Smith: *Nature* **187**, 483-485 (1960).
24. J. P. Mayer, F. Zhang, R. D. DiMarchi: *Biopolymers* **88**, 687-713 (2007).
25. P. Walter, R. Gilmore, G. Blobel: *Cell* **38**, 5-8 (1984).
26. L. Zakova, J. Jiracek: *Chem Listy* **99**, 772-781 (2005).
27. E. Rinderknecht, R. E. Humbel: *J Biol Chem* **253**, 2769-2776 (1978).
28. W. H. Daughaday, P. Rotwein: *Endocr Rev* **10**, 68-91 (1989).
29. G. Bentley, E. Dodson, G. Dodson, D. Hodgkin, D. Mercola: *Nature* **261**, 166-168 (1976).
30. R. M. Cooke, T. S. Harvey, I. D. Campbell: *Biochemistry-US* **30**, 5484-5491 (1991).
31. H. Terasawa, D. Kohda, H. Hatanaka, K. Nagata, N. Higashihashi, H. Fujiwara, K. Sakano, F. Inagaki: *EMBO J* **13**, 5590-5597 (1994).
32. S. J. Chan, D. F. Steiner: *Am Zool* **40**, 213-222 (2000).
33. H. Werner, D. Weinstein, I. Bentov: *Arch Physiol Biochem* **114**, 17-22 (2008).
34. K. Siddle, *Front Endocrinol*: **3**, Article 34, 1-24 (2012).
35. M. P. Czech: *Cell* **31**, 8-10 (1982).
36. E. M. Schaefer, K. Siddle, L. Ellis: *J Biol Chem* **265**, 13248-13253 (1990).
37. M. Kasuga, F. A. Karlsson, C. R. Kahn: *Science* **215**, 185-187 (1982).
38. T. E. Adams, V. C. Epa, T. P. J. Garrett, C. W. Ward: *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1050-1093 (2000).
39. J. Bass, G. Chiu, Y. Argon, D. F. Steiner: *J Cell Bio* **141**, 637-646 (1998).
40. S. Yakar, H. Sun, H. Zhao, P. Pennisi, Y. Toyoshima, J. Setser, B. Stannard, L. Scavo, D. LeRoith: *Pediatr Endocrinol Rev* **3**, 11-19 (2005).
41. S. Seino, M. Seino, S. Nishi, G. I. Bell: *P Natl Acad Sci USA* **86**, 114-118 (1989).
42. M. C. Lawrence, N. M. McKern, C. W. Ward: *Curr Opin Struc Biol* **17**, 699-705 (2007).

43. P. De Meyts: *Trends Biochem Sci* **33**, 376-384 (2008).
44. A. Belfiore, F. Frasca, G. Pandini, L. Sciacca, R. Vigneri: *Endocr Rev* **30**, 586-623 (2009).
45. D. E. Moller, A. Yokota, J. F. Caro, J. S. Flier: *Mol Endocrinol* **3**, 1263-1269 (1989).
46. F. Frasca, C. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore, R. Vigneri: *Mol Cell Biol* **19**, 3278-3288 (1999).
47. L. Mosthaf, B. Vogt, H. U. Haring, A. Ullrich: *P Natl Acad Sci USA* **88**, 4728-4730 (1991).
48. A. M. Abbott, R. Bueno, M. T. Pedrini, J. M. Murray, R. J. Smith: *J Biol Chem* **267**, 10759-10763 (1992).
49. A. Ullrich, A. Gray, A. W. Tam, T. Yangfeng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. Lebon, S. Kathuria, E. Chen, S. Jacobs, U. Francke, J. Ramachandran, Y. Fujitayamaguchi: *EMBO J* **5**, 2503-2512 (1986).
50. M. Federici, O. Porzio, L. Zucaro, A. Fusco, P. Borboni, D. Lauro, G. Sesti: *Mol Cell Endocrino* **129**, 121-126 (1997).
51. C. Blanquart, J. Achi, T. Issad: *Biochem Pharmacol* **76**, 873-883 (2008).
52. M. A. Soos, B. T. Nave, K. Siddle: *Adv Exp Med Biol* **343**, 145-157 (1993).
53. M. M. Rechler, S. P. Nissley: *Annu Rev Physiol* **47**, 425-442 (1985).
54. P. Lobel, N. M. Dahms, S. Kornfeld: *J Biol Chem* **263**, 2563-2570 (1988).
55. R. G. Macdonald, M. A. Tepper, K. B. Clairmont, S. B. Perregaux, M. P. Czech: *J Biol Chem* **264**, 3256-3261 (1989).
56. S. Kornfeld: *Annu Rev Biochem* **61**, 307-330 (1992).
57. J. Frystyk: *Growth Horm IGF Res* **14**, 337-375 (2004).
58. H. S. Kim, A. R. Ingermann, J. Tsubaki, S. M. Twigg, G. E. Walker, Y. Oh: *Cancer Res* **64**, 2229-2237 (2004).
59. C. M. Perks, P. V. Newcomb, M. R. Norman, J. M. P. Holly: *J Mol Endocrinol* **22**, 141-150 (1999).
60. J. F. Youngren: *Cell Mol Life Sci* **64**, 873-891 (2007).
61. P. A. Wilden, K. Siddle, E. Haring, J. M. Backer, M. F. White, C. R. Kahn: *J Biol Chem* **267**, 13719-13727 (1992).

62. S. R. Hubbard, L. Wei, L. Elis, W. A. Hendrickson: *Nature* **372**, 746-754 (1994).
63. S. R. Hubbard: *EMBO J* **16**, 5572-5581 (1997).
64. J. M. Backer, G. G. Schroeder, C. R. Kahn, M. G. Myers, P. A. Wilden, D. A. Cahill, M. F. White: *J Biol Chem* **267**, 1367-1374 (1992).
65. H. Maegawa, D. A. McClain, G. Freidenberg, J. M. Olefsky, M. Napier, T. Lipari, T. J. Dull, J. Lee, A. Ullrich: *J Biol Chem* **263**, 8912-8917 (1988).
66. M. Jensen, P. De Meyts: *Vitam Horm* **80**, 51-75 (2009).
67. O. V. Chaika, N. Chaika, D. J. Volle, H. Hayashi, Y. Ebina, L. M. Wang, J. H. Pierce, R. E. Lewis: *J Biol Chem* **274**, 12075-12080 (1999).
68. H. Kato, T. N. Faria, B. Stannard, C. T. Roberts, D. Leroith: *Mol Endocrinol* **8**, 40-50 (1994).
69. A. A. Butler, S. Yakar, I. H. Gewolb, M. Karas, Y. Okubo, D. LeRoith: *Comp Biochem Phys B* **121**, 19-26 (1998).
70. S. Harada, G. L. Esch, M. Holgado-Madruga, A. J. Wong: *DNA Cell Biol* **20**, 223-229 (2001).
71. M. J. Wick, L. Q. Dong, D. R. Hu, P. Langlais, F. Liu: *J Biol Chem* **276**, 42843-42850 (2001).
72. D. S. Cai, S. Dhe-Paganon, P. A. Melendez, J. S. Lee, S. E. Shoelson: *J Biol Chem* **278**, 25323-25330 (2003).
73. X. J. Sun, P. Rothenberg, C. R. Kahn, J. M. Backer, E. Araki, P. A. Wilden, D. A. Cahill, B. J. Goldstein, M. F. White: *Nature* **352**, 73-77 (1991).
74. X. J. Sun, L. M. Wang, Y. T. Zhang, L. Yenush, M. G. Myers, E. Glasheen, W. S. Lane, J. H. Pierce, M. F. White: *Nature* **377**, 173-177 (1995).
75. B. E. Lavan, W. S. Lane, G. E. Lienhard: *J Biol Chem* **272**, 11439-11443 (1997).
76. B. E. Lavan, V. R. Fantin, E. T. Chang, W. S. Lane, S. R. Keller, G. E. Lienhard: *J Biol Chem* **272**, 21403-21407 (1997).
77. T. Brummer, C. Schmitz-Peiffer, R. J. Daly: *FEBS J* **277**, 4356-4369 (2010).
78. L. Yenush, K. J. Makati, J. SmithHall, O. Ishibashi, M. G. Myers, M. F. White: *J Biol Chem* **271**, 24300-24306 (1996).
79. J. E. Harlan, P. J. Hajduk, H. S. Yoon, S. W. Fesik: *Nature* **371**, 168-170 (1994).

80. G. Inoue, B. Cheatham, R. Emkey, C. R. Kahn: *J Biol Chem* **273**, 11548-11555 (1998).
81. B. Giovannone, M. L. Scaldaferri, M. Federici, O. Porzio, D. Lauro, A. Fusco, P. Sbraccia, P. Borboni, R. Lauro, G. Sesti: *Diabetes-Metab Res* **16**, 434-441 (2000).
82. G. Pelicci, L. Dente, A. DeGiuseppe, B. VerducciGalletti, S. Giuli, S. Mele, C. Vetriani, M. Giorgio, P. P. Pandolfi, G. Cesareni, P. G. Pelicci: *Oncogene* **13**, 633-641 (1996).
83. L. Luzi, S. Confalonieri, P. P. Di Fiore, P. G. Pelicci: *Curr Opin Genet Dev* **10**, 668-674 (2000).
84. T. Trub, W. E. Choi, G. Wolf, E. Ottinger, Y. J. Chen, M. Weiss, S. E. Shoelson: *J Biol Chem* **270**, 18205-18208 (1995).
85. T. A. Gustafson, W. M. He, A. Craparo, C. D. Schaub, T. J. Oneill: *Mol Cell Biol* **15**, 2500-2508 (1995).
86. L. Laviola, A. Natalicchio, F. Giorgino: *Curr Pharm Design* **13**, 663-669 (2007).
87. M. G. Myers, J. M. Backer, X. J. Sun, S. Shoelson, P. Hu, J. Schlessinger, M. Yoakim, B. Schaffhausen, M. F. White: *P Natl Acad Sci USA* **89**, 10350-10354 (1992).
88. D. R. Alessi, S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. J. Gaffney, C. B. Reese, P. Cohen: *Curr Biol* **7**, 261-269 (1997).
89. S. Frame, P. Cohen: *Biochem J* **359**, 1-16 (2001).
90. H. Sano, S. Kane, E. Sano, C. P. Miinea, J. M. Asara, W. S. Lane, C. W. Garner, G. E. Lienhard: *J Biol Chem* **278**, 14599-14602 (2003).
91. T. E. Harris, J. C. Lawrence: *Sci STKE* **2003**, Review 15, 1-17 (2003).
92. P. R. Shepherd, D. J. Withers, K. Siddle: *Biochem J* **333**, 471-490 (1998).
93. E. Y. Skolnik, C. H. Lee, A. Batzer, L. M. Vicentini, M. Zhou, R. Daly, M. J. Myers, J. M. Backer, A. Ullrich, M. F. White, J. Schlessinger: *EMBO J* **12**, 1929-1936 (1993).
94. K. Yamauchi, J. E. Pessin: *J Biol Chem* **269**, 31107-31114 (1994).
95. C. M. Boney, P. A. Gruppuso, R. A. Faris, A. R. Frackelton: *Mol Endocrinol* **14**, 805-813 (2000).
96. Y. Takahashi, K. Tobe, H. Kadowaki, D. Katsumata, Y. Fukushima, Y. Yazaki, Y. Akanuma, T. Kadowaki: *Endocrinology* **138**, 741-750 (1997)

97. L. Bonfini, C. A. Karlovich, C. Dasgupta, U. Banerjee: *Science* **255**, 603-606 (1992).
98. K. S. Ravichandran: *Oncogene* **20**, 6322-6330 (2001).
99. J. Pouyssegur, V. Volmat, P. Lenormand: *Biochem Pharmacol* **64**, 755-763 (2002).
100. L. Mosthaf, K. Grako, T. J. Dull, L. Coussens, A. Ullrich, D. A. McClain: *EMBO J* **9**, 2409-2413 (1990).
101. A. Denley, E. R. Bonython, G. W. Booker, L. J. Cosgrove, B. E. Forbes, C. W. Ward, J. C. Wallace: *Mol Endocrinol* **18**, 2502-2512 (2004).
102. S. Benyoucef, K. H. Surinya, D. Hadaschik, K. Siddle: *Biochem J* **403**, 603-613 (2007).
103. E. J. Gallagher, Y. Fierz, R. D. Ferguson, D. LeRoith: *Endocr Pract* **16**, 864-873 (2010).
104. J. Jiracek, L. Zakova, E. Antolikova, C. J. Watson, J. P. Turkenburg, G. G. Dodson, A. M. Brzozowski: *P Natl Acad Sci USA* **107**, 1966-1970 (2010).
105. M. Fujita, K. Ieguchi, D. M. Cedano-Prieto, A. Fong, C. Wilkerson, J. Q. Chen, M. Wu, S. H. Lo, A. T. W. Cheung, M. D. Wilson, R. D. Cardiff, A. D. Borowsky, Y. K. Takada, Y. Takada: *J Biol Chem* **288**, 19593-19603 (2013).
106. Y. Sohma, B. L. Pentelute, J. Whittaker, Q. X. Hua, L. J. Whittaker, M. A. Weiss, S. B. Kent: *Angew Chem Int Edit* **47**, 1102-1106 (2008).
107. A. N. Ziegler, S. Chidambaram, B. E. Forbes, T. L. Wood, S. W. Levison: *J Biol Chem* **289**, 4626-4633 (2014).
108. Q. X. Hua, M. Liu, S. Q. Hu, W. H. Jia, P. Arvan, M. A. Weiss: *J Biol Chem* **281**, 24889-24899 (2006).
109. S. H. Nakagawa, H. S. Tager: *J Biol Chem* **266**, 11502-11509 (1991).
110. R. D. DiMarchi, R. E. Chance, H. B. Long, J. E. Shields, L. J. Sliker: *Horm Res* **41**, 93-96 (1994).
111. M. Dreyer, R. Prager, A. Robinson, K. Busch, G. Ellis, E. Souhami, R. Van Leendert: *Horm Metab Res* **37**, 702-707 (2005).
112. J. Rosenstock, S. L. Schwartz, C. M. Clark, G. D. Park, D. W. Donley, M. B. Edwards: *Diabetes Care* **24**, 631-636 (2001).
113. J. Plank, M. Bodenlenz, F. Sinner, C. Magnes, E. Gorzer, W. Regittnig, L. A. Endahl, E. Draeger, M. Zdravkovic, T. R. Pieber: *Diabetes Care* **28**, 1107-1112 (2005).

114. J. Saegusa, S. Yamaji, K. Ieguchi, C. Y. Wu, K. S. Lam, F. T. Liu, Y. K. Takada, Y. Takada: *J Biol Chem* **284**, 24106-24114 (2009).
115. A. M. Brzozowski, E. J. Dodson, G. G. Dodson, G. N. Murshudov, C. Verma, J. P. Turkenburg, F. M. de Bree, Z. Dauter: *Biochemistry-US* **41**, 9389-9397 (2002).
116. J. Jansen, S. C. Vanbuuloffers, C. M. Hoogerbrugge, J. L. Vandenbrande: *Biochem J* **266**, 513-520 (1990).
117. R. B. Merrifield: *Biochemistry-US* **3**, 1385-1390 (1964).
118. P. De Meyts: Insulin and Growth Hormone Receptors in Human Cultured Lymphocytes and Peripheral Blood Monocytes, v knize *Methods in Receptor Research*, (Dekker, M. ed.), 301-383, New York (1976).
119. M. M. Bradford: *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
120. L. Sciacca, M. F. Cassarino, M. Genua, G. Pandini, R. Le Moli, S. Squatrito, R. Vigneri: *Diabetologia* **53**, 1743-1753 (2010).
121. R. E. Chance, J. A. Hoffmann, E. P. Kroeff, M. G. Johnson, E. W. Schirmer, W. W. Bromer: *Proceedings of the 7th American Peptide Symposium - Peptides: Synthesis, Structure and Function* (Rich, D. H., Gross, E., Ed), 721-728, Rockford, Illinois, Pierce Chemical Company (1981).
122. J. A. Miller, L. O. Narhi, Q. X. Hua, R. Rosenfeld, T. Arakawa, M. Rohde, S. Prestrelski, S. Lauren, K. S. Stoney, L. Tsai, M. A. Weiss: *Biochemistry-US* **32**, 5203-5213 (1993).
123. N. Tennagels, U. Werner: *Arch Physiol Biochem* **119**, 1-14 (2013).
124. L. Gauguin, B. Klaproth, W. Sajid, A. S. Andersen, K. A. McNeil, B. E. Forbes, P. De Meyts: *J Biol Chem* **283**, 2604-2613 (2008).
125. D. C. Mynarcik, G. Q. Yu, J. Whittaker: *J Biol Chem* **271**, 2439-2442 (1996).
126. A. Morrione, B. Valentinis, S. Q. Xu, G. Yumet, A. Louvi, A. Efstratiadis, R. Baserga: *P Natl Acad Sci USA* **94**, 3777-3782 (1997).
127. A. Louvi, D. Accili, A. Efstratiadis: *Dev Biol* **189**, 33-48 (1997).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]